

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Untersuchung der Reaktionszyklen  
von Chaperoninen aus *Escherichia coli* und *Thermoplasma acidophilum*  
mit Hilfe der Neutronenkleinwinkelstreuung**

Jörg Holzinger

aus

Nürnberg

2002

### Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Dr. Hermann Heumann betreut.

### **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 6.2.2002



(Jörg Holzinger)

Dissertation eingereicht am 8.2.2002

- |              |                        |
|--------------|------------------------|
| 1. Gutachter | PD Dr. Hermann Heumann |
| 2. Gutachter | Prof. Patrick Cramer   |

Mündliche Prüfung am 26.03.2002

## Inhalt

1. Einleitung	3
1.1. Chaperonine	3
1.1.1. Vorbemerkung	3
1.1.2. Grundlagen der Proteinfaltung	3
1.1.3. assistierte Proteinfaltung	5
Hsp70-System	6
GroE	6
weitere an der Faltung beteiligte Proteinklassen	11
Thermosom und andere nichtbakterielle Chaperonine	11
1.2. Die Neutronenkleinwinkelstreuung (SANS)	13
1.2.1. Kleinwinkelstreuung im Kontext strukturbioologischer Methoden	13
1.2.2. Besonderheiten der Neutronenkleinwinkelstreuung	14
2. Ergebnisse	18
2.1 statische Experimente am System GroE	18
2.1.1. Vorversuche an teildeutertem GroEL und GroES	18
2.1.2. Versuche an single-ring-GroEL	20
2.1.3. Titrationsversuche am Football-Komplex	24
2.1.4. statische Versuche am Co-Chaperonin GP31	36
2.1.5. Substratbindung von GroEL	41
2.2. kinetische Versuche	47
2.2.1. langsame Kinetiken:	
chasing-Versuche an den Co-Chaperoninen GroES und GP31	47
2.2.2. schnelle Kinetiken mit Hilfe der stopped-flow-Technik	56
2.3. statische Versuche am Thermosom	60
2.3.1. Konformationsänderungen zwischen offener und geschlossener Struktur	60
Kristallstruktur versus EM-Struktur	60
Nukleotidabhängigkeit der Konformation bei $\alpha\beta$ -Thermosom	64
Temperatur- und Nukleotidabhängigkeit der Konformation bei $\alpha\alpha$ - und $\alpha\beta$ -Thermosom	65
2.3.2. Aggregationseffekte in Lösung	69
3. Diskussion	74
3.1. statische Experimente ohne Co-Chaperonin oder Substratprotein	74
3.2. statische Experimente mit Co-Chaperonin oder Substratprotein	76
3.3. kinetische Experimente	78
4. Material und Methoden	81
4.1. theoretische Grundlagen der Kleinwinkelstreuung	81
4.2. Aufbau des SANS-Diffraktometers D22 am ILL	85
4.3. instrumentelle Parameter bei den SANS-Messungen	86
4.4. Datenbehandlung	88
4.5. indirekte Fouriertransformation	91

4.6. Modellierung von Streukurven und Abstandsverteilungsfunktionen	92
4.7. Proteinreinigung und Puffer	94
5. Zusammenfassung	97
Problemstellung	97
Ergebnisse	98
6. Literatur	101
7. Abkürzungen	109
Danksagung	110
Lebenslauf	111

# **1. Einleitung**

## **1.1. Chaperonine**

### **1.1.1. Vorbemerkung**

Nach der Theorie der RNA-Welt wurden zu Beginn des Leben auf der Erde von der RNA (Ribonukleinsäure) sowohl katalytische, d.h. enzymatische Funktionen als auch die Funktion der Informationsspeicherung erfüllt.

Heutiges Leben besteht aus Zellen, deren Eigenschaften in der Abfolge der Basen der DNA (Desoxyribonukleinsäure) gespeichert sind. Die Hauptfunktion der DNA ist die Codierung von Proteinenstrukturen : genetische Information der DNA wird zunächst bei der Transkription in m-RNA (messenger-RNA) umgeschrieben, bei der Translation am Ribosom wird dann von der m-RNA die Aminosäuresequenz des Proteins abgelesen. Als Ergebnis der Translation bildet sich damit zunächst eine eindimensionale Peptidkette; damit ein Protein seine Funktion erfüllen kann, muß es sich in seine korrekte, die „nativen“ Konformation falten oder gefaltet werden. Die Proteine können je nach Fall als Enzym (also als Katalysator), als Strukturprotein oder als Signalprotein dienen.

Das Verständnis der Proteinfaltung ist nicht nur aus Sicht der Grundlagenforschung interessant. Bei zahlreichen Krankheiten zählt Proteinfehlfaltung zu den Ursachen oder Symptomen, etwa bei Alzheimer oder den Prionenkrankheiten, die sogar den Sprung auf die Titelseiten der Regenbogenpresse geschafft haben. Auch für die industrielle Anwendung hat ein besseres Verständnis der Faltung von Proteinen eine große Bedeutung, da eine qualitative und quantitative Verbesserung der Proteinexpression von erheblicher wirtschaftlicher Bedeutung ist.

*In vitro* kann sich ein Protein unter geeigneten Pufferbedingungen zur nativen Konformation falten. In der Zelle dagegen haben sich im Laufe der Evolution eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt, die Proteine während ihrer Neubildung bei der Faltung unterstützen, Fehlfaltungen verhindern und denaturierten oder aggregierten Proteinen dabei assistieren, zum nativen Zustand zurückzufinden. Einer dieser Mechanismen ist die vorübergehende Bindung an andere Proteine, sogenannte Chaperone.

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, durch Strukturuntersuchungen der Chaperonine, einer Klasse von „Faltungshelfern“, einen Beitrag zum Verständnis der Proteinfaltung zu leisten.

### **1.1.2. Grundlagen der Proteinfaltung**

Strukturelemente von Proteinen werden üblicherweise in vier Stufen unterteilt:

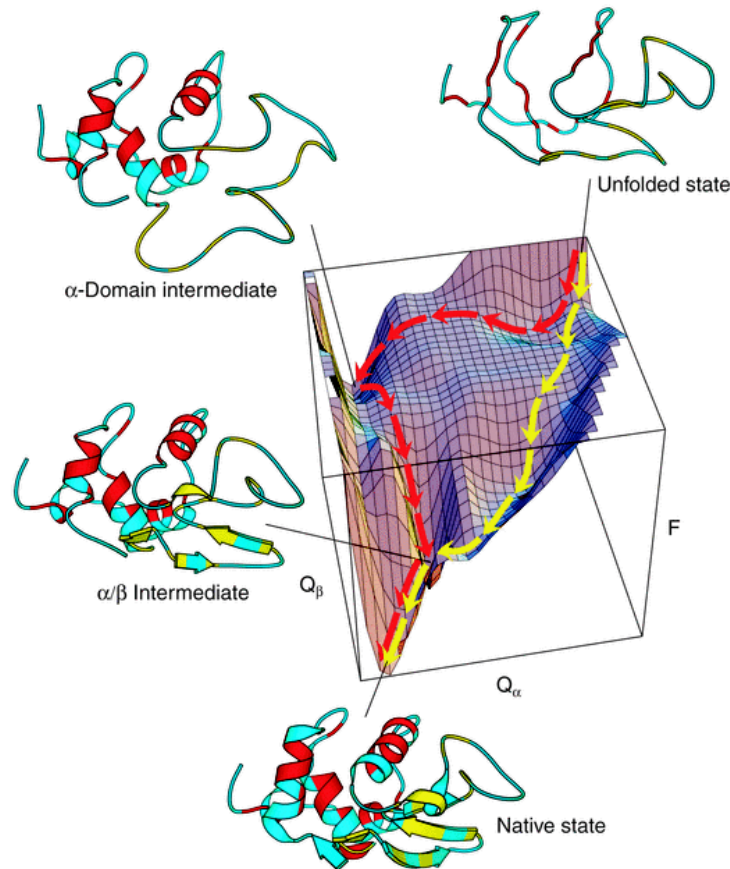
Die lineare Polypeptidkette eines Proteins wird Primärstruktur genannt. Ordnet sich diese lokal zu  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblattstrukturen, bezeichnet man dies als Sekundärstruktur. Bilden diese Elemente wiederum gemeinsame Domänen, heißt dies Tertiärstruktur. Große Proteine sind häufig aus mehreren Domänen zusammengesetzt, diese Ebene der Ordnung ist die Quartärstruktur.

1940 wurde von Anfinsen gezeigt, daß ein in Harnstoff denaturiertes Protein mit reduzierten Disulfidbrückenbindungen, in seinem Fall die RNase A durch eine Oxidierung der Disulfidbindungen und die Verdünnung des Harnstoffs wieder vollständig renaturiert werden kann. Er schloß daraus, daß die Strukturinformation für die korrekte Faltung eines Proteins vollständig in der Primärstruktur enthalten ist, das Protein bräuchte im Prinzip zum Erreichen seiner nativen Struktur keine Unterstützung (Anfinsen).

Betrachtet man die Größe eines Proteins und schätzt man die für Strukturänderungen normalerweise benötigte Zeit, so überrascht es zunächst, daß Proteine so schnell ihre native Konformation erreichen: nimmt man an, daß jede Aminosäure zwei Konformationen besetzen kann, dann hätte ein Protein aus 100 Aminosäuren  $2^{100}$  ( $\sim 10^{30}$ ) mögliche Konformationen. Könnten sich diese Konformationen etwa  $10^{11}$  mal pro Sekunde ändern, so würde ein Durchlaufen dieser Möglichkeiten etwa  $10^{11}$  Jahre dauern. Das Ergebnis dieser Überlegung steht im Widerspruch zu der Tatsache, daß in der Realität Proteinfaltung in der Größenordnung von Sekunden stattfindet. Proteinfaltung kann also nicht durch ein zufälliges „Ausprobieren“ aller denkbaren Konformationen geschehen (Dinner et al.).

Die freie Energie eines Proteins hängt von einer Vielzahl von Parametern ab, dies läßt sich graphisch in Form einer Energiehyperfläche darstellen (Abb. 1.1). Bei Konformationsänderungen wandert das Protein entlang dieser Oberfläche. Polypeptidketten, bei denen eine Konformation ein starkes Energieminimum darstellt, wurden von der Evolution begünstigt. In dreidimensionalen Modelldarstellungen haben daher diese Oberflächen meistens die Form eines Trichters, so daß eine Faltung in Richtung des nativen Zustands bevorzugt wird. Dabei existieren aber eine Vielzahl von Wegen, diesen zu erreichen.

Mehrere Sonderfälle weichen von diesem Prinzip ab. Im Fall des Prions bilden pathogene und nicht-pathogene Konformation zwei durch hohe Energiebarrieren getrennte tiefe Energieminima (Jackson et al.). Zwei Proteine, das Tau-Protein, ein Regulator der Mikrotubuli und Prothymosin  $\alpha$ , ein Protein mit bisher ungeklärter Funktion sind mit ungefalteter oder nur teilweise gefalteter Struktur aktiv (Gast et al.).



T/BS

Abb. 1.1: Beispiel einer „free energy surface“: Faltung von Hühnerlysozym  
F: freie Enthalpie,  $Q_\alpha$ ,  $Q_\beta$ : Zahl der nativen Kontakte in  $\alpha$  und  $\beta$ -Domäne  
aus Dinner et al.

### 1.1.3. Assistierte Proteinfaltung

In vivo und auch bei den meisten in vitro-Experimenten ergeben sich eine Reihe von Komplikationen bei der Proteinfaltung: während der Translation ist zunächst nur ein Teil der Polypeptidkette vorhanden. Deren Energielandschaft unterscheidet sich von der des vollständigen Proteins. Des weiteren findet man sowohl in der Zelle als auch bei in vitro-Expression sehr hohe Konzentrationen von Proteinen und anderen Makromolekülen (typischerweise in der Größenordnung von mehreren 100 mg/ml im Gegensatz zu Größenordnung von  $\mu\text{g/ml}$  bis wenigen mg/ml bei den meisten in vitro-Experimenten an voll exprimierten Proteinen).

Werden voll exprimierte, native Proteine durch chemischem oder thermischem Stress denaturiert, aggregieren sie. Auch durch lokale Nebenminima können sich Fehlfaltungen ergeben, vor allen bei größeren – und Mehrdomänenproteinen.

Die physiologischen Bedingungen für die Rückfaltung sind natürlich nicht immer so günstig, wie bei in vitro-Rückfaltungsexperimenten, da eine Zelle weder externen Stress vermeiden, noch die Proteinkonzentrationen verdünnen kann.

Zur Lösung dieser Probleme haben sich im Laufe der Evolution eine Reihe teilweise hierarchischer Mechanismen gebildet, die hier zunächst am Beispiel von *E. coli* beschrieben werden (Gottesman et al.).

Die meisten in die Proteinfaltung involvierten Proteine werden in verschiedenen „Chaperon“- oder „Hsp“ (von heat-shock protein)-Klassen zusammengefaßt. Zur Unterscheidung benennt man sie nach dem Molekulargewicht der Untereinheiten in kiloDalton, z. B. Hsp60, Hsp70 oder Hsp 90.

### **Hsp70-System**

Das Hsp70-System bildet die erste Stufe der Hierarchie; es besteht aus den Komponenten DnaJ, DnaK und GrpE (Gottesman et al.). Durch Interaktionen zwischen den drei Chaperonen werden unter ATP-Verbrauch elongierte Polypeptidketten gebunden und wieder freigesetzt. Vor allem naszierende Peptide am Ribosom sind davon betroffen.

Der Hauptbestandteil des Systems ist DnaK, ein Monomer mit 70 kDa. Es besteht aus einer Peptidbindungsdomäne, die hydrophobe Reste bindet und einer ATPase-Domäne. Nicht nur die Proteinfaltung, sondern auch die Regulation der Expression einer Reihe von Proteinen zählt zu den Aufgaben von DnaK.

DnaJ, ein Protein der Hsp40-Klasse, arbeitet als Cochaperon von DnaK und verstärkt dessen Substratbindungsfähigkeit. Es besteht aus vier Domänen; ein Teil dieser Struktur bindet entfaltetes Substratprotein, ein anderer Teil DnaK.

GrpE, ein Dimer mit 22 kDa, wirkt als Nukleotidaustauschfaktor von DnaK. Es bindet an die ATPase Domäne von DnaK und verändert die Affinitäten zu DnaJ und dem Substratprotein.

### **GroE**

GroE ist das Hsp60-System von *E. coli*. Es besteht aus dem Chaperonin GroEL und dem Co-Chaperonin GroES (Chaperonin ist die Bezeichnung für Chaperone der Hsp60-Klasse). Aus der Röntgenkristallographie und der Elektronenmikroskopie kommen eine Vielzahl von Strukturinformationen über GroE:

GroEL ist ein Tetradekamer mit einer Masse von 800 kDa aus 14 Untereinheiten, die zylinderförmig aus zwei Ringen mit sieben Monomeren angeordnet sind (Braig et al.) (Abb. 1.2). Im Zentrum des Zylinders gibt es eine Trennwand zwischen den beiden Ringen, so daß ein GroEL Oligomer zwei Hohlräume zur Faltung von Substratprotein besitzt. Die Monomere (57 kDa) bestehen aus jeweils drei Domänen. Von den äquatorialen Domänen werden die Kontakte zwischen den Untereinheiten vermittelt. Am oberen Teil ihrer nach außen gerichteten Oberfläche liegt die Nukleotid-Bindungsstelle. An der Außenseite des Zylinders liegen die apikalen Domänen. Sie binden an den Innenwänden des Zylinders das Substratprotein und an der nach oben gerichteten Seite GroES (Xu et al.). Als Scharnierstelle zwischen äquatorialen und apikalen Teilen dienen die intermediären Domänen.



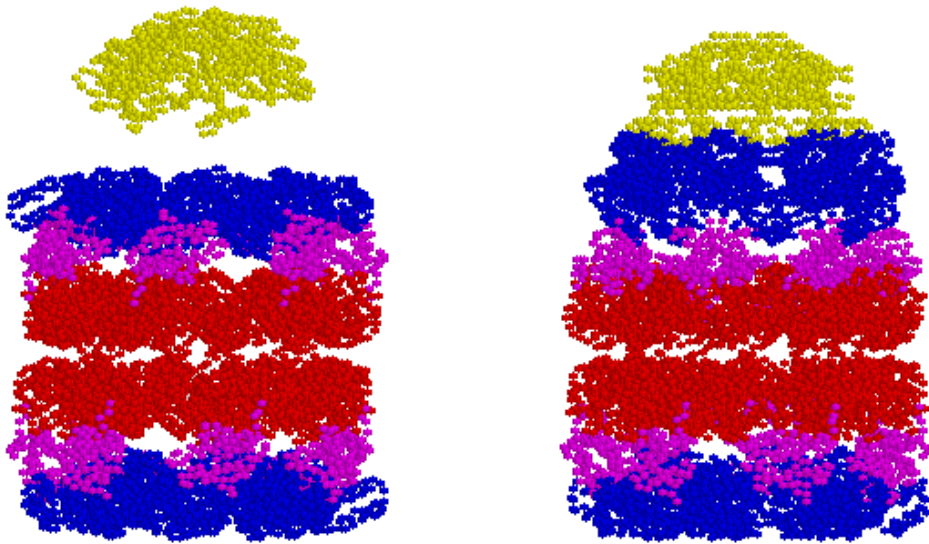


Abb. 1.2: Strukturen von GroEL und GroES

links oben: Kristallstruktur von GroES, ergänzt um ein Modell der mobile loops (Hunt et al., 1996, Stegmann et al.)

links unten: Kristallstruktur von GroEL (Braig et al.)

rechts: Kristallstruktur des GroEL-GroES-ADP Komplexes (Xu et al.)

gelb: GroES, blau: GroEL, apikale Domänen, violett: GroEL, intermediäre Domänen, rot: GroEL, äquatoriale Domänen

Die Bindung von Nukleotiden an GroEL führt zu deutlichen Domänenbewegungen innerhalb des Proteins (Roseman et al.)(Abb. 1.3).

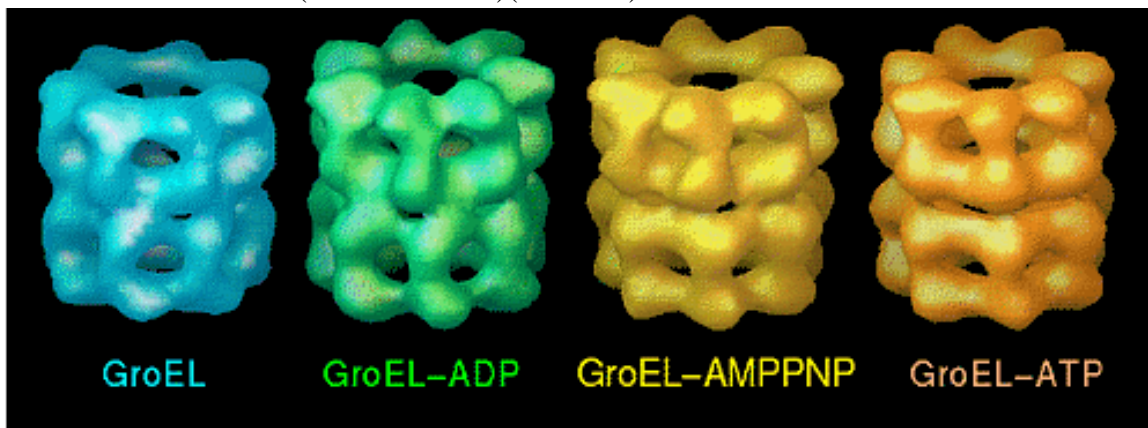


Abb. 1.3: elektronenmikroskopische Modelle von GroEL-Nukleotid-Komplexen (Roseman et al., 1996)

Das Co-Chaperonin GroES (ein Hsp 10) bildet aus seinen Untereinheiten von 10 kDa ein kuppelförmiges Heptamer (Hunt et al, 1996)(Abb. 1.2). Während des Reaktionszyklus von GroE kann es auf einer oder auf zwei Seiten an GroEL binden und damit das Substratprotein einschließen (Abb. 1.4, 1.5). An der Außenseite hat jede Domäne einen „mobile loop“ aus 18 Aminosäuren, der die Bindungsstelle zu GroEL bildet. 1:1-Komplexe aus GroEL und GroES werden „bullet-complex“ oder „dome-like complex“

genannt, 1:2-Komplexe „football-complex“ nach der Form des amerikanischen Footballs (Abb. 1.4).

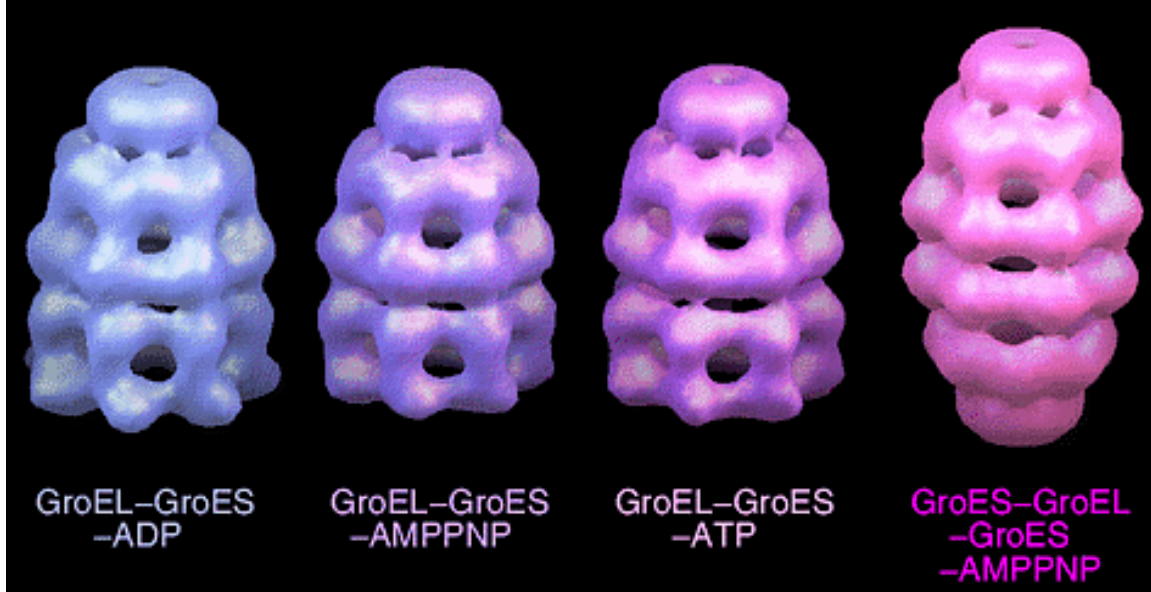


Abb. 1.4: elektronenmikroskopische Modelle von GroEL-GroES-Nukleotid-Komplexen (Roseman et al., 1996)

Die Bindung von ATP an GroEL ist innerhalb eines Ringes hochkooperativ (Horovitz et al., 2001). Die Struktur eines Heptamers wechselt dabei durch starke Domänenverschiebungen von einem T-Zustand mit einer relativ hydrophoben Innenwand der Hohlzylinders zu einem R-Zustand mit einem eher hydrophilen und wesentlich größeren Innenraum. Zwischen zwei Ringen ist die ATP-Bindung dagegen stark antikooperativ. Die Bindung von ADP und des nichthydrolysierbaren ATP-Analogs AMP-PNP weist dagegen nach einer Reihe von Arbeiten keine Kooperativität auf.

Ein mit Nukleotid beladener GroEL-Ring kann GroES binden. Somit schließt GroES im so geformten asymmetrischen Komplex ein vorher von GroEL gebundenes Substratprotein in den GroEL-Innenraum ein. Dabei vergrößert sich das Innenvolumen des „cis-Rings“ fast um den Faktor zwei (Xu et al.).

Als mögliche Funktion von GroEL wird eine räumliche Trennung von denaturierten Proteinen voneinander zur Vermeidung von Aggregationen vorgeschlagen. Nach diesem Modell bezeichnet man den von GroES abgeschlossenen Hohlraum, der denaturiertes Protein aus der Lösung entfernt, als „Anfinsen cage“ (Ellis).

Neben dem Modell einer passiven Abschirmung der denaturierten Substratproteine voneinander wird auch ein aktiver Mechanismus von GroEL durch eine Entfaltung des Substratproteins vorgeschlagen (Shtilerman et al.). Danach bindet denaturiertes Substratprotein an mehrere Stellen der GroEL-Innenwand. Durch die Domänenbewegungen nach der ATP-Bindung wird das Substratprotein gestreckt, so daß es ein lokales energetisches Minimum verläßt und eine neue Chance zum Erreichen des nativen Zustands erhält. Dieses Modell wurde mit Isotopenaustauschexperimenten stark untermauert, es schließt aber eine Relevanz der Abschirmungsfunktion von GroEL nicht aus.

Den von GroEL, Substratprotein, GroES und ATP gebildeten Komplex kann man als Ausgangspunkt des GroE-Reaktionszyklus betrachten (Abb. 1.5, oben, Zeichnung und Modell aus Grallert et al.). ATP hydrolysiert sehr schnell zu ADP, der ADP-Bullet-Komplex hat unterschiedliche Konformation und Bindungseigenschaften. Auf der trans-Seite kann somit ein zweites Substratprotein binden, der cis-Ring ändert dadurch wiederum seine Konformation. In diesem Zustand besteht keine Antikooperativität zwischen ATP-Bindung am trans-Ring und ADP-Bindung am cis-Ring mehr. Wird dann der trans-Ring mit ATP besetzt, lösen sich ADP, GroES und Substratprotein vom cis-Ring. Nach bestimmten Modellen kann sich durch die Bindung von GroES an den trans-Ring zu diesem Zeitpunkt vorübergehend ein Football-Komplex bilden. Die Ablösung von GroES vom cis-Ring würde dadurch noch beschleunigt werden. Falls zu diesem Zeitpunkt tatsächlich Substratprotein an den trans-Ring gebunden ist, beginnt ein neuer Reaktionszyklus. Die Dauer eines solchen Zyklus beträgt etwa 10 Sekunden.

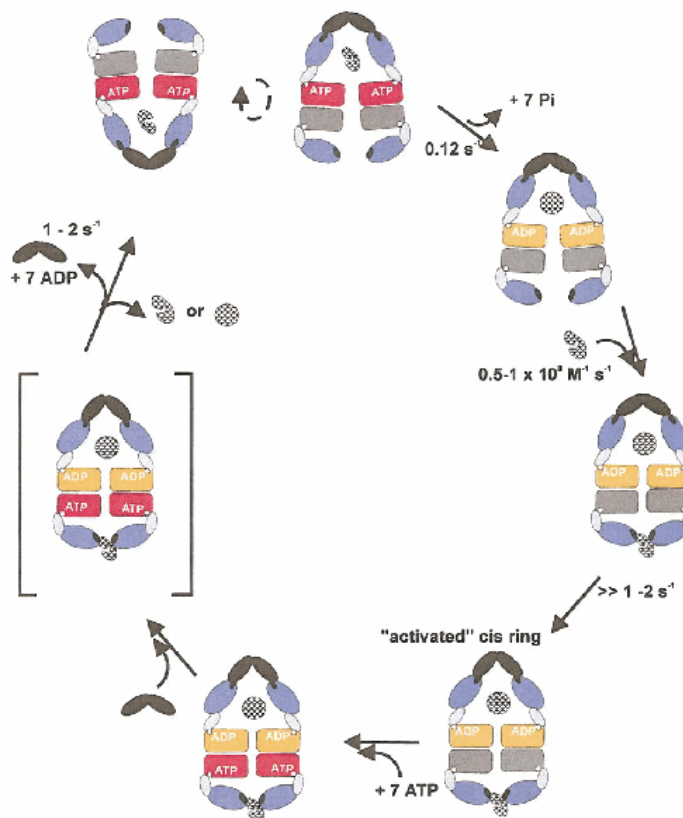


Abb. 1.5: Modell für den GroE-Reaktionszyklus (Grallert et al.)

Football-Komplexe aus GroEL und GroES sind nur in Anwesenheit von ATP oder der nicht hydrolysierbaren ATP-Analoga AMP-PNP und  $\gamma$ S-ATP beobachtet worden (Grallert et al.). Sie können ein oder zwei Substratproteine einschließen (Llorca et al., 1997, Beissinger et al.).

Auch wenn im allgemeinen Sprachgebrauch die Bezeichnung „symmetrisch“ weitverbreitet ist, muß davon ausgegangen werden, daß Football-Komplexe in Wirklichkeit eine strukturelle und funktionelle Pseudosymmetrie aufweisen. In einem symmetrischen Modell, bei dem beide Ringe die cis-Konformation der asymmetrischen

Kristallstruktur hätten, käme es zu sterischen Überlappungen in Bereich der Äquatorialebene (Ma et al.). In vivo kann abgesehen davon ist in Anbetracht des Reaktionszyklus und der Antikoooperativität der ATP-Bindung von einem Football-Komplex mit einem ATP- und einem ADP-Ring ausgegangen werden. Versuche mit dem ATP-Analogen AMP-PNP zeigten eine wesentlich größere Bildungsrate von Football-Komplexen bei einem Gemisch von ADP und AMP-PNP (Gorovits et al.). Versuche zur Substratentfaltung belegen die Asymmetrie der AMP-PNP-Football-Komplexe (Shtilerman): es wurde gezeigt, daß in AMP-PNP-Komplexen das Substratprotein nicht mehr an GroEL gebunden ist, aber im Komplex eingeschlossen bleibt. Demzufolge muß GroES auf der Substratbindungsseite stabil gebunden sein. Wäre die Bindung des zweiten GroES genauso stark, müßte man bei mittleren Konzentrationen und einem GroEL-GroES-Verhältnis von 1:2 fast ausschließlich Football-Komplexe vorfinden, dies ist jedoch nicht der Fall.

Die Bedeutung des Football-Komplex für die Funktion von GroEL ist umstritten: es wurde nachgewiesen, daß der GroE-Reaktionszyklus ohne Football-Komplexe als intermediäre Struktur auskommt (Hayer-Hartl et al., 1999). Andererseits wurde vorgeschlagen, daß in einem Flip-flop-Mechanismus Football-Komplexe den ATP-Verbrauch um die Hälfte reduzieren könnten (Grallert et al., 2001).

### GP31

Bemerkenswerterweise haben mehrere Bakteriophagen ihr eigenes Co-Chaperonin entwickelt, das GroES in der infizierten Zelle ersetzt (Ang et al.). Das Co-Chaperonin GP31 des Phagen T4 kann in vitro und in vivo GroES substituieren (van der Vies, 1994, Marusich, 1998). Mit einem Molekulargewicht von 12 kDA pro Untereinheit ist es geringfügig größer als GroES. Trotz einer sehr geringen Sequenzhomologie sind die Tertiär- und Quartärstrukturen von GP31 und GroES fast identisch (Hunt et al., 1997)(Abb. 1.6). Dennoch ist die korrekte Faltung des Proteins GP23 für den Phagenkopf nur in Anwesenheit von GP31 möglich. Ausgehend von der Kristallstruktur wurde vorgeschlagen, daß GP31 den Anfinsen-Cage und die Hydrophobizität von GroEL vergrößert.

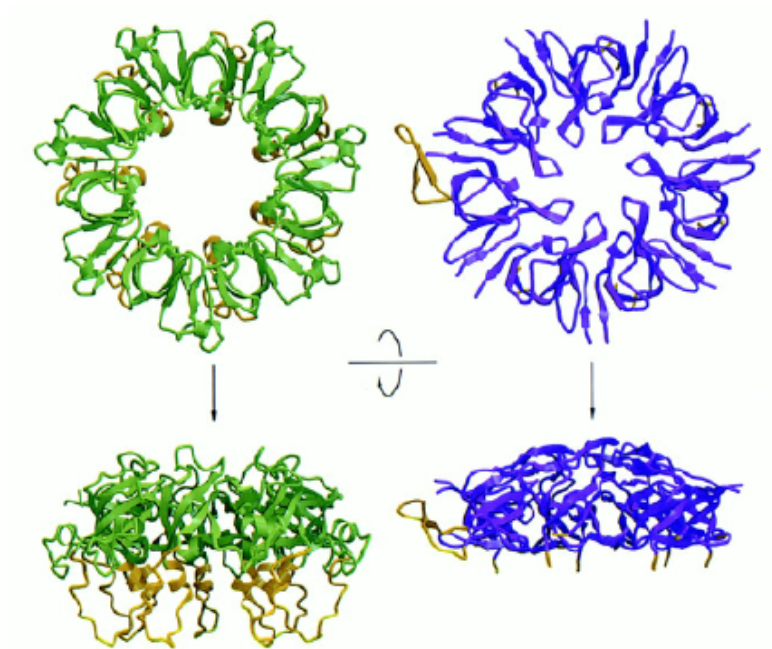


Abb. 1.6: Kristallstrukturen von GP31 (links) und GroES (rechts)  
6 der 7 mobile loops von GroES sind nicht aufgelöst.

### Weitere an der Faltung beteiligte Proteinklassen

Eine Reihe weiterer Chaperonfamilien ist an der Proteinfaltung mit zum Teil noch nicht verstandenen Mechanismen beteiligt, speziell die Hsp90-Klasse (in Fall von *E. coli* HtpG) und die kleinen heat-shock proteins.

Weitere Proteine, wie die PDI (Protein-Disulfid Isomerase) und die PPIase (Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase) werden zwar nicht zu den Chaperonen gezählt, sind aber dennoch häufig für eine korrekte Proteinfaltung notwendig.

### Thermosom und andere nichtbakterielle Chaperonine

In Mitochondrien und Chloroplasten von Eukaryonten findet man Chaperonine mit einer nahen genetischen und strukturellen Verwandtschaft zu GroEL/GroES (Gupta). Mt-cpn60 etwa tritt normalerweise ebenfalls in Form von Tetradekameren auf (teilweise wird allerdings auch in Form von Heptameren gefunden), es hat ebenfalls ein cpn10 als Co-Chaperonin und wird durch thermische Schocks induziert. Chaperonine von Eubakterien und Organellen werden zur Chaperoningruppe I zusammengefaßt.

Die Chaperonine von Archaeen und dem Cytosol von GroEL bilden die Gruppe II; sie haben sich schon relativ früh in der Evolution von der Gruppe I abgetrennt (Gutsche et al., 1999, Carrascosa). Der deutlichste Unterschied zu ihren Verwandten ist das Fehlen eines Co-Chaperonins, Ihre Struktur wird wie bei der Gruppe I von zwei gegeneinandergesteckten Ringen gebildet, diese liegen teilweise als Oktamere oder Nonamere vor und können aus zwei oder drei Gruppen von Untereinheiten mit leichten Sequenzunterschieden bestehen. Die Innenseiten des Hohlzylinders mit den Substratbindungsstellen können durch interne Domänenverschiebungen geschlossen



werden, dies kann mit der Funktion von GroES im Anfinsen-Cage-Modell verglichen werden.

Das Archaeen-Chaperonin Thermosom von *Thermoplasma acidophilum* zählt zu den am häufigsten untersuchten Chaperoninen der Gruppe II. Es besteht aus 16 Untereinheiten (Ditzel et al., 1998); in den beiden Ringen wechseln sich  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten ab. Bisher ist der funktionelle Unterschied zwischen den beiden Untereinheiten nicht verstanden. Bei Expression der beiden Untereinheiten in *E. coli* entstehen nicht nur  $\alpha\beta$ -Thermosomen, sondern auch „all- $\alpha$ “ und „all- $\beta$ “-Chaperonine.

In der Röntgenkristallstruktur ist das Thermosom geschlossen (Ditzel et al.). Dreidimensionale EM-Aufnahmen zeigen offene und geschlossene Strukturen (Abb. 1.7) sowie eine „Bullet-Konformation“ des Thermosoms (Nitsch et al., Schoen et al., 2000, JMB 296). Bei der „Bullet-Konformation“ sind jeweils ein Ring offen und einer geschlossen. In einer Arbeit mit zweidimensionaler EM wurden sogar vier Konformationen des Chaperonins nachgewiesen (Gutsche et al., 2000, FEBS).

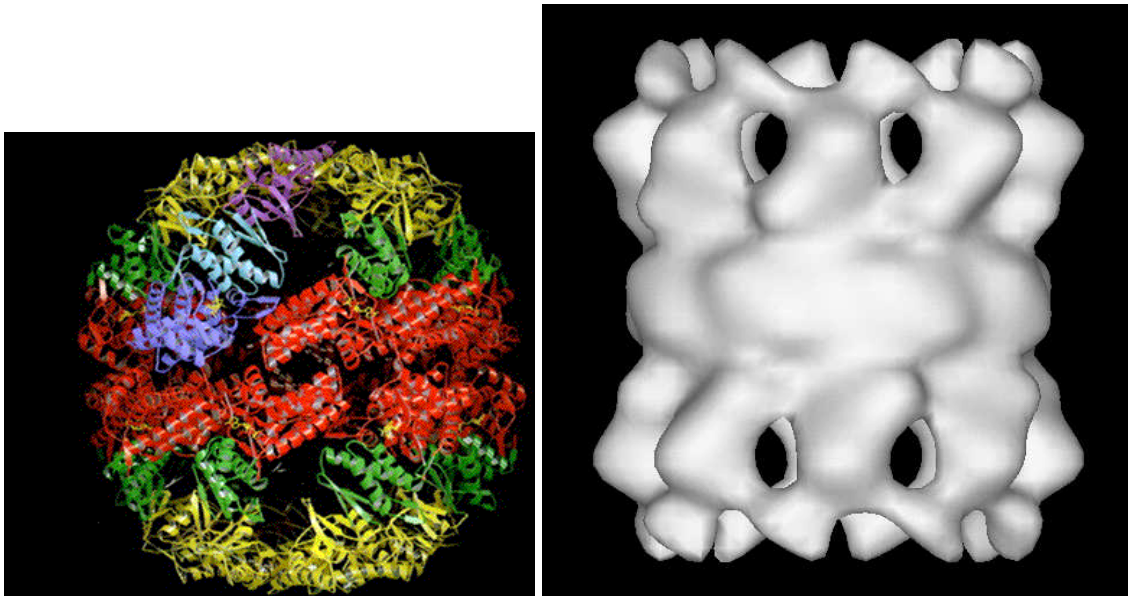


Abb. 1.7: Struktur von  $\alpha\beta$ -Thermosom von *Thermoplasma acidophilum*

a: Modell auf der Basis der Kristallstruktur

b: Darstellung auf der Basis von negative-stain EM nach Bildverarbeitung (Nitsch et al.)

Das Thermosom ist ein heat-shock protein, (Phipps et al., 1999) seine Substrate sind allerdings noch nicht identifiziert.

TRiC/CCT, das dem Thermosom relativ nah verwandte Chaperonin des Eukaryontencytosol, wird nicht durch Hitze induziert. Zu seinen Substraten zählen Aktin und Myosin (Dunn et al.).

Eukaryontische Chaperone und Chaperonine gewinnen zunehmendes Interesse in medizinischer Forschung und Praxis. Sie können das Immunsystem anregen und werden daher als Krebstherapeutikum diskutiert. Während der Apoptose und beim Herzinfarkt werden sie in großen Mengen exprimiert, auch in diesem Zusammenhang wird die Verwendung als Medikament diskutiert (Feng et al., Tanonaka et al.).

## 1.2. Die Neutronenkleinwinkelstreuung (SANS)

### 1.2.1. Kleinwinkelstreuung im Kontext strukturbioologischer Methoden

Im letzten Jahrzehnt haben DNA-Sequenzierungstechniken und damit die Kenntnis der Genome verschiedenster Organismen Fortschritte gemacht, die noch vor einer halben Generation unmöglich erschienen wären. Die nächste große Herausforderung der Molekularbiologie ist das Verständnis der Funktion der Genprodukte, also in erster Linie der Proteine. Dies beinhaltet das Verständnis des Zusammenhangs zwischen Struktur und Funktion von Proteinen.

Von vielen Proteinen gibt es heute Strukturmodelle in atomarer Auflösung auf der Basis von Röntgenkristallographiedaten. Die Elektronenmikroskopie ermöglicht Abbildungen der Struktur von in Lösung eingefrorenen Proteinen mit Auflösungen von bis zu 8 Å.

Viele Fragestellungen erfordern es jedoch, Proteine in Lösung bei ihrer physiologischen Temperatur zu beobachten: zur Kristallisation eines Proteins ist meistens die Anwesenheit von Salzen in unphysiologischen Konzentrationen notwendig. Im Kristall unterliegt das Protein dann Kräften seiner Nachbarmoleküle. Zudem hat es natürlich nicht mehr die Freiheit, mit anderen großen Molekülen Komplexe einzugehen, oder diese aufzulösen, ohne daß der Kristall zerfällt. Die Elektronenmikroskopie kann zwar mit Proteinlösungen arbeiten, werden aber beispielsweise Proben bei hohen Temperaturen oder hohen Salzkonzentrationen eingefroren, verschlechtert sich die Qualität der Proben massiv. Auch der Vorgang des Einfrierens selbst kann die Probe verändern.

Mit der Kernresonanz (NMR) können Proteinstrukturen direkt in Lösung untersucht werden. Um gute Signale zu erhalten wird bei NMR-Messungen üblicherweise ein möglichst niedriger pH angestrebt. Die Methode liefert vor allem Information über die Sekundärstruktur, bei kleinen Proteinen (bis zu etwa 50 kDa) erlaubt sie aber auch die Erarbeitung von Modellen der Tertiärstruktur mit atomarer Auflösung.

Die Kleinwinkelstreuung erlaubt es, große Moleküle in Lösung zu beobachten. Sie hat eine Auflösung um die 10 Å, die Information ist allerdings auch innerhalb dieser Grenze nicht eindeutig, d.h., theoretisch können zwei unterschiedliche Strukturen die gleiche Streukurve haben. Ein großer Teil der Anwendungen entfällt daher auf nichtbiologische Systeme, die nur in Lösung existieren und bei denen Mischungen aus vielen Strukturen vorliegen.

Trotz großer Fortschritte der oben geschilderten besser auflösenden Methoden kann die Kleinwinkelstreuung (SAS) von Proteinlösungen nach wie vor in vielen Fällen zu wertvollen Erkenntnissen führen. Wie bei der NMR besteht eine wesentlich größere Freiheit bei der Auswahl von Pufferbedingungen und Temperatur, zudem ist man keinen Einschränkungen bei der Wahl des pH unterworfen. Die untere Grenze für die Größe der zu betrachteten Proteine liegt bei etwa 30 kDa. In der Vergangenheit wurde die Kleinwinkelstreuung eingesetzt um erste Strukturmodelle vorzuschlagen, wenn andere Methoden nicht funktionierten. Heute werden Streukurven meistens auf der Basis der Modellen, die mit anderen Methoden erhalten wurden, interpretiert, um komplementäre Information über die Lösungsstruktur zu gewinnen.

SAS-Experimente können mit Röntgenstrahlen und mit Neutronen durchgeführt werden. In den meisten Fällen werden Röntgenstrahlen benutzt, da sie einfacher und billiger herzustellen sind. In bestimmten Situationen hat jedoch die Neutronenstreuung

bemerkenswerte Vorteile, vor allem durch die Möglichkeit Teile von Komplexen durch Isotopenmarkierung besonders hervorzuheben (siehe 1.2.3).

### **1.2.2. Besonderheiten der Neutronenkleinwinkelstreuung**

Die Grundprinzipien von SANS und SAXS sind identisch. Röntgenstreuung hat dabei den Vorteil, daß sie einfacher und mit wesentlich höherem Fluß erzeugt werden kann. Kleinere Röntgenquellen sind zudem auch im Labormaßstab verfügbar. Trotz des um Größenordnungen geringeren Flusses und eines höheren Preis hat die Neutronenstreuung jedoch Eigenschaften, die sie für manche Anwendungen unverzichtbar machen (Williams et al., Jacrot, Glatter, 1982):

#### **Kontrastausgleich und Kontrastvariation**

Da Neutronen nicht von den Elektronen sondern vom Kern gestreut werden, haben unterschiedliche Isotope eines Atoms unterschiedliche Streulängen. Dieser Unterschied ist beim unter den biologisch relevanten Atomen beim Wasserstoff am stärksten ausgeprägt.  $^2\text{H}$ -markierte („deuterierte“) Moleküle haben damit eine höhere Streulängendichtedichte, als ihre Äquivalente mit normaler Isotopenverteilung (Abb. 1.8), die im folgenden als „protoniert“ bezeichnet werden, da unter natürlichen Bedingungen der Anteil von  $^2\text{H}$  und  $^3\text{H}$  für SANS vernachlässigbar gering ist.



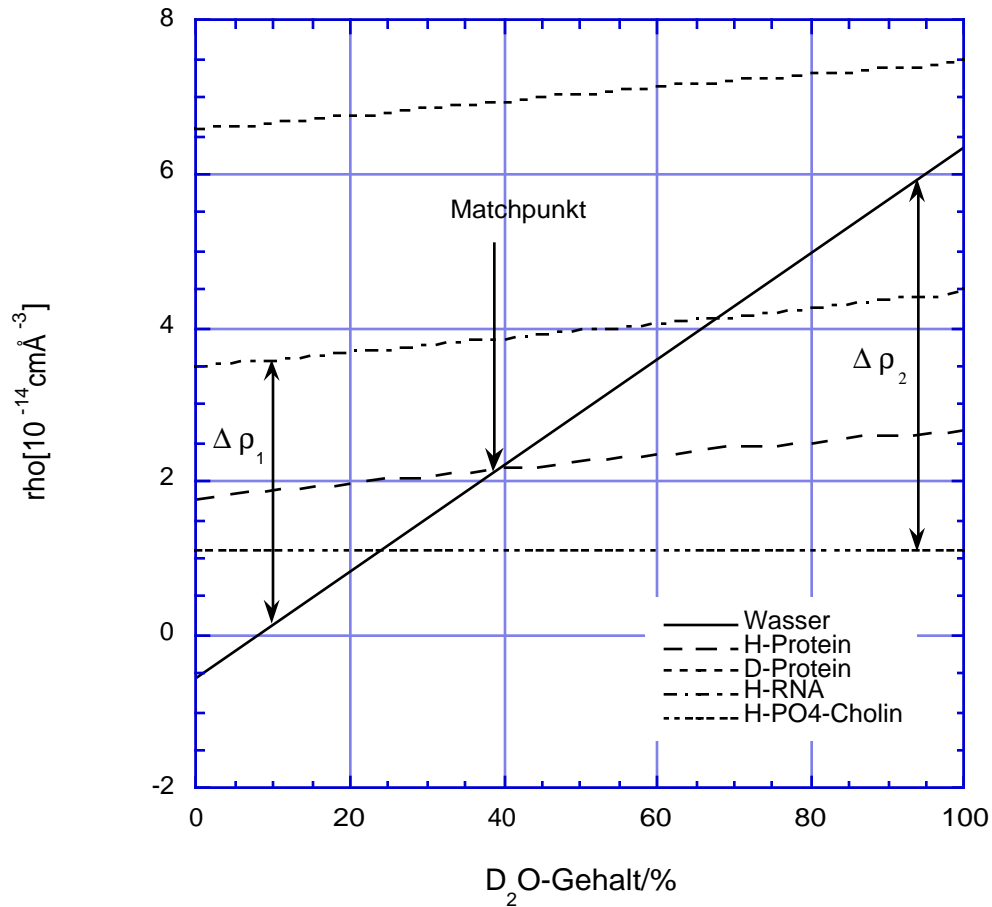


Abb. 1.8: Streulängendichten und Kontraste von Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) und verschiedenen Biomolekülen in Abhängigkeit des  $\text{D}_2\text{O}$ -Gehalts des Puffers mit Matchpunkt von protoniertem Protein

Am „Matchpunkt“ sind Streulängendichte von Puffer und Probe identisch, der Kontrast ist gleich Null (in Abb. 1.8 entspricht dies den Schnittpunkten zwischen den Geraden für Wasser und für die Probenmoleküle). Hat das betrachtete Molekül eine homogene Streudichte, was meistens in erster Näherung zutrifft, ist es am Matchpunkt für die Neutronen „unsichtbar“. Dies ermöglicht ausgewählte Bestandteile in Komplexen aus Elementen unterschiedlicher Streulängendichte unsichtbar zu machen und andere hervorzuheben. Durch Kontrastvariationsreihen können verschiedene Elemente einer Probe nacheinander beleuchtet werden. Der Deuterierungsgrad des Puffers bestimmt, welche Elemente jeweils sichtbar sind, mit zunehmender Deuterierung würde in Abb.1.8 die Linie für Wasser nach oben verschoben. Im Fall von Protein-Nukleinsäure oder Protein-Lipidkomplexen ist dies prinzipiell möglich, wenn alle Bestandteile protoniert sind. Bei Protein-Protein-Komplexen muß dazu ein Bestandteil spezifisch markiert

werden, üblicherweise durch Deuterierung. In dieser Arbeit wurde der Kontrastausgleich vor allem dazu benutzt, GroES oder Substratprotein im Komplex mit GroEL hervorzuheben (Abb. 1.9 und 1.10, a-c).

Hat in einem Komplex eine Komponente eine höhere Streudichte als der Puffer und eine andere eine niedrigere, so ergibt sich daraus eine negative Interferenz. Auf der Ebene der  $p(r)$ -Funktion zeigt sich diese unter Umständen in negativen Werten für bestimmte Abstände. Wir konnten in solchen Versuchen die Bindung von Co-Chaperonin an GroEL nachweisen (Abb. 1.9 und 1.10, d). Liegt ein einheitlicher Kontrast der beiden Komplexbestandteile vor, so manifestiert sich die Bindung auch in einer Vergrößerung des Streumassenradius oder der Nullwinkelstreuung. In diesem Fall können jedoch Artefakte (etwa durch Aggregationen) nur schwer ausgeschlossen werden.

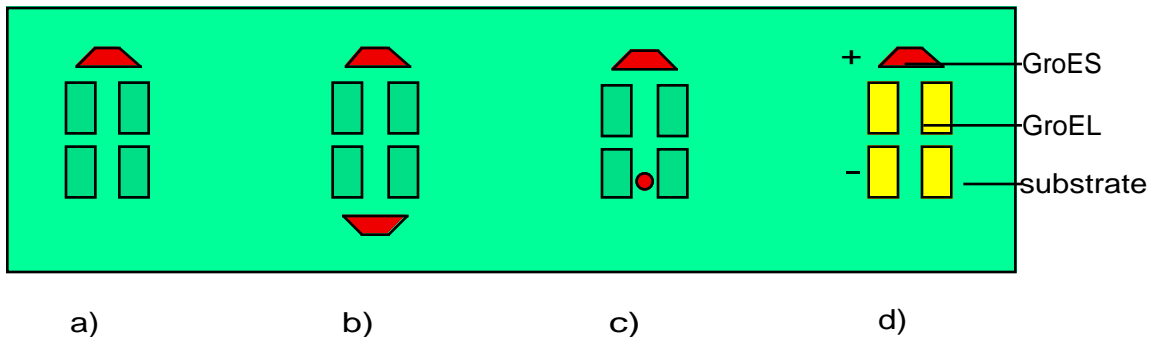


Abb. 1.9: Möglichkeiten der Kontrastvariation am Beispiel GroE:

a: unsichtbares GroEL mit gebundenen sichtbarem GroES

b: Football-Komplex mit unsichtbarem GroEL

c: GroEL-GroES-Substrat trans-Komplex mit unsichtbarem GroEL

d: Komplex aus GroEL mit negativem und GroES mit positivem Kontrast

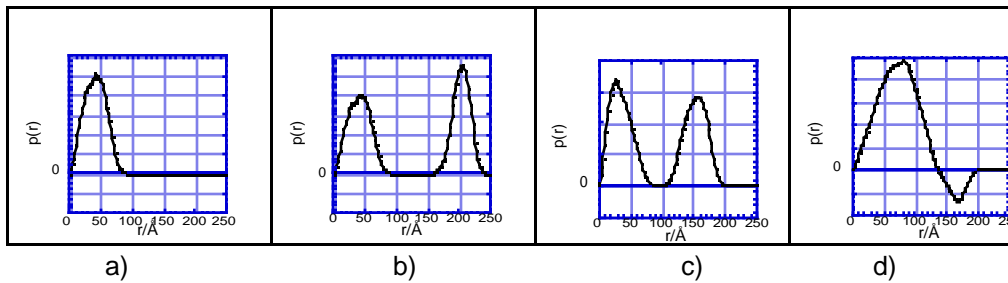


Abb. 1.10: den Modellen von Abb. 1.9 entsprechende  $p(r)$ -Funktionen

Die wichtigsten Vorteile der Neutronenstreuung gegenüber der Röntgenstreuung sind die Möglichkeiten von Kontrastausgleich und Kontrastvariation. Abgesehen davon hat die Neutronenstreuung noch einige weitere Vorteile:

- Bei Messungen in  $D_2O$  erhält man mit Neutronen ein wesentlich besseres Signal-Rausch-Verhältnis, als bei Röntgenmessungen.
- Langsame Neutronen verursachen praktisch keine Strahlenschäden. Dies erlaubt es, z.B. bereits gemessene Proben zu modifizieren und noch einmal unter den neuen Bedingungen zu messen.
- Die Wellenlängen von SANS-Experimenten sind üblicherweise etwa um den Faktor 10 größer als bei SAXS. Da der  $q$ -Wert eines Winkels gemäß (1.8) von der Wellenlänge abhängt, können mit SANS leichter kleine  $q$ -Werte, also größere Strukturen, gemessen werden.
- SANS-Daten können leichter absolut ausgewertet werden, da ihre Streuintensität genauer mit Referenzproben verglichen werden kann. Damit ist es möglich bei bekannter Konzentration eines Moleküls seine Masse oder bei bekannter Masse die Konzentration zu bestimmen.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 statische Experimente am System GroE

#### 2.1.1. Vorversuche an teildeutertem GroEL und GroES

Der Matchpunkt von protoniertem Protein, wie es in der Natur vorliegt, liegt bei etwa 40% D<sub>2</sub>O. Neutronenstreuungsmessungen in diesem Puffer haben den Nachteil eines sehr hohen inkohärenten Untergrundes durch die H-Atome im Puffer. Durch die Deuterierung von Protein kann der Matchpunkt zu höheren D<sub>2</sub>O-Konzentrationen hin verschoben und damit der Untergrund verringert werden. Ein vollständig deuteriertes Protein hat allerdings einen theoretischen Matchpunkt bei 120% D<sub>2</sub>O, der nicht erreichbar ist. Um ein Protein in reinem D<sub>2</sub>O messen zu können, müsste es zu etwa 74% deuteriert sein. Bei Untersuchungen am GroE-System hätte die Verfügbarkeit von teildeutertem GroEL zudem den Vorteil, daß bei Experimenten mit GroEL und Substratprotein das Substrat in protonierter Form benutzt werden kann und damit eine wesentlich größere Freiheit bei dessen Wahl besteht.

Die Expression eines teildeuterten Proteins gestaltet sich jedoch aus mehreren Gründen schwierig: Zunächst wachsen Bakterien und Hefen in schwerem Wasser wesentlich schlechter (Katz et al.). Da *E. coli* beim Einbau zwischen Protonen und Deuteronen unterscheiden kann, muß bei der Zucht auf eine bestmögliche Konstanz der Wachstumsbedingungen geachtet werden. Auch bei konstanten Bedingungen jedoch wird es auf Grund lokaler und zeitlicher Schwankungen in den Medien zu Heterogenitäten beim Einbau der Deuteronen in die Proteine kommen, d.h. bei einer Messung am mittleren Matchpunkt bleibt ein Teil des Proteins, wenn auch mit einem geringen Kontrast, sichtbar.

Nachdem die Expression und Reinigung von teildeutertem GroEL und GroES gelang, mußte also überprüft werden, ob deren Qualität für die angestrebten Messungen ausreicht.

Zur Kontrolle der Homogenität des Deuterierungsgrades dieses Proteins wurden Massenspektroskopiemessungen durchgeführt. Diese zeigten, daß tatsächlich eine gewisse Streuung des Molekulargewichts der Proteine um ihre Mittelwerte vorliegt. Modellrechnungen zeigten in der Tat, daß der Effekt der Inhomogenitäten auf die SANS-Messungen innerhalb von deren Fehlergrenzen liegt (Daten nicht gezeigt).

Wird das teildeuterte GroEL verwendet, um in gematchter Form einen Komplex mit einem sichtbaren Protein zu bilden, tragen nicht nur die Eigenterme der Teilkomponenten des Komplexes zur Streukurve bei, sondern auch der Interferenzterm zwischen protonierten und teildeutertem Protein. Um die Auswirkungen dieses Effekts zu überprüfen, wurden Komplexe aus teildeutertem GroEL mit protoniertem GroES in Anwesenheit von ADP untersucht; dies erlaubt den Vergleich mit den gut untersuchten analogen Komplexen aus protoniertem GroEL und volldeutertem GroES in 40% D<sub>2</sub>O (Stegmann et al.)

## partially deuterated GroEL (MRE) with protonated GroES and ADP

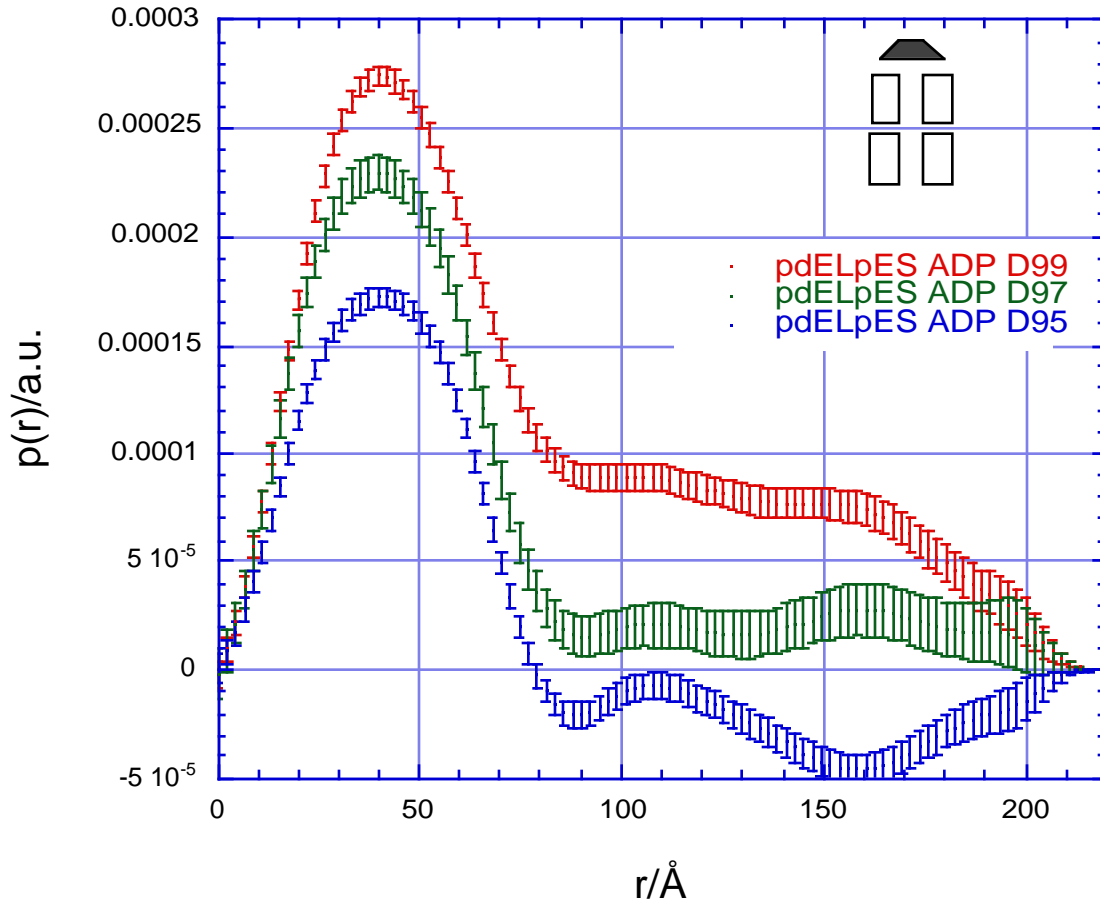


Abb. 2.1: Kontrastvariation, Komplex aus teildeutertem GroEL und protoniertem GroES mit ADP, Verhältnis 1:1

Das Ergebnis der Kontrastvariation ist in der Form von Abstandsverteilungsfunktionen sehr anschaulich (Abb. 2.1), die Kurven haben eine gute Datenqualität. Der Peak bei den kleinen Abständen entspricht dem Eigenterm des deutlich sichtbaren GroES. Die Werte der mittleren und großen Abstände in den Kurven werden vom Eigenterm von GroEL und vom Interferenzterm zwischen GroEL und GroES bestimmt.

Im Puffer mit 99% D<sub>2</sub>O ist GroEL nicht vollständig gematcht, seine Streulängendichte hat das gleiche Vorzeichen wie GroES. Die Interferenzen zwischen den Proteinen sind damit positiv; dies erklärt die deutlich positiven Werte im rechten Teil der Kurve.

Bei 97% D<sub>2</sub>O nähern sich die Daten bei den großen Abständen stark der Nulllinie an, das Signal von GroEL ist also fast vollständig unterdrückt. Die negativen Werte im rechten Teil der Kurve bei 95% D<sub>2</sub>O sind ein Beweis, daß tatsächlich ein Komplex vorliegt, da negative Werte in p(r)-Funktionen nur bei Komplexen zwischen Molekülen mit positivem und negativem Kontrast auftreten können.

Mit dieser Messung wurde auch das frühere Ergebnis einer Strukturänderung von GroES bei der Bindung an GroEL reproduziert (Stegmann et al.): auf der Ebene der  $p(r)$ -Funktion ist die für freies GroES charakteristische Schulter verschwunden.

Analoge Experimente aus einer anderen Zucht ergaben ähnliche Ergebnisse mit einem Matchpunkt von 97%  $D_2O$ .

### **2.1.2. Versuche an single-ring-GroEL**

Um die Bedeutung der negativen Kooperativität zwischen den beiden Ringen in GroEL besser verstehen zu können, wurde eine „single-ring“-Mutante konstruiert (Hayer-Hartl et al., 1996). Diese besteht, wie der Name sagt, aus einem einzigen Heptamer. Unterschiede zwischen wild-type und single-ring GroEL geben können Hinweise auf die Rolle des zweiten Rings des Chaperonins geben.

Der Einzelring kann Substratprotein und GroES binden. Das Substrat kann auch zurückgefaltet werden, es kann allerdings den Innenraum des Hohlzylinders nicht verlassen: ohne den GroEL-trans-Ring bleibt GroES gebunden, da für seine Lösung allosterische Wechselwirkungen zwischen den Ringen erforderlich sind. Es liegt nah, zu prüfen, ob es in Lösung strukturelle Besonderheiten des single-rings bzw. des single-ring-GroES-Komplexes, wie sie in EM-Versuchen (Llorca et al., 1997) beobachtet wurden. In diesem Zusammenhang stellt sich auch die Frage, ob an single-ring GroEL gebundenes GroES seine Konformation ähnlich ändert, wie GroES im Komplex mit wild-type GroEL (Stegmann et al., JSB) . Hierzu wurden eine Reihe von SANS-Messungen durchgeführt: (Holzinger, 2000)

- Messungen an single-ring GroEL alleine und mit verschiedenen Nukleotiden
- Messungen an Komplexen aus protoniertem single-ring GroEL mit protoniertem GroES und ADP
- Messungen an Komplexen aus protoniertem, gematchten single-ring GroEL mit deuteriertem GroES und ADP

Die Untersuchung von single-ring-GroEL ohne Nukleotid und Co-Chaperonin ergab Unterschiede zwischen verschiedenen Messungen (Abb. 2.2). Aus Gründen, die wir nicht verstehen, hat das Protein also nicht immer die selbe Struktur gezeigt. Bei einigen Messungen sind die Ergebnisse ist einem Modell auf der Basis der GroEL-Kristallstruktur sehr nah, andere Daten zeigen erhebliche Unterschiede dazu.

(Für die Versuche am single-ring GroEL werden nur die Abstandsverteilungsfunktionen gezeigt, da in diesem Fall den Streukurven keine andere oder anschaulichere Information entnommen werden könnte.)

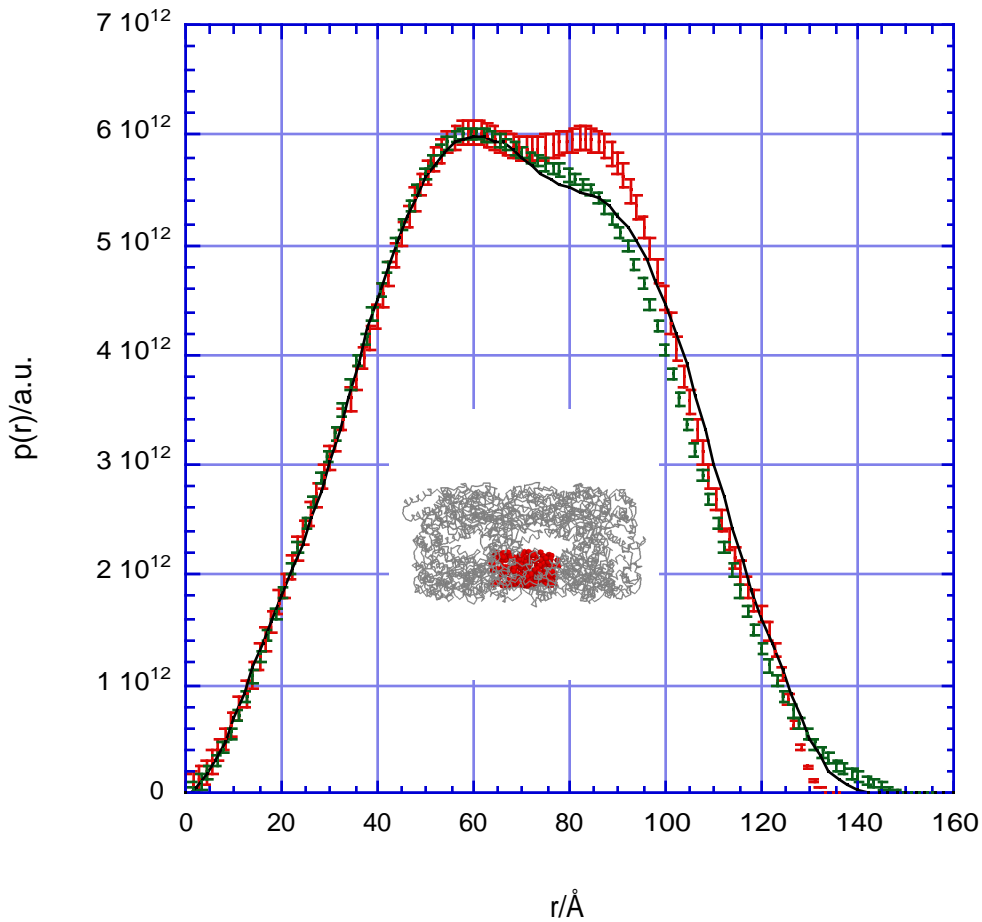


Abb. 2.2: GroEL single ring (protoniert, ohne Nukleotide in  $D_2O$ -Puffer), Modell (schwarz) und experimentelle Daten (rot und grün)  
Die Einfügung zeigt das verwendete Modell.

Experimente über die Nukleotid-Bindung von single-ring-GroEL ohne GroES zeigten keine deutlichen Strukturänderungen außerhalb der Fehlergrenzen.

Ebenso wie wild-type-GroES kann single-ring-GroEL in Gegenwart von Nukleotiden Komplexe bilden. Mit Hilfe von ADP wurden Komplexe aus protoniertem GroEL single-ring und protoniertem GroES gebildet. Die gemessenen Daten stimmen gut mit einem Modell auf der Basis der GroEL-GroES-ADP-Kristallstruktur aus dem GroEL-cis-Ring und GroES überein (Abb. 2.3).

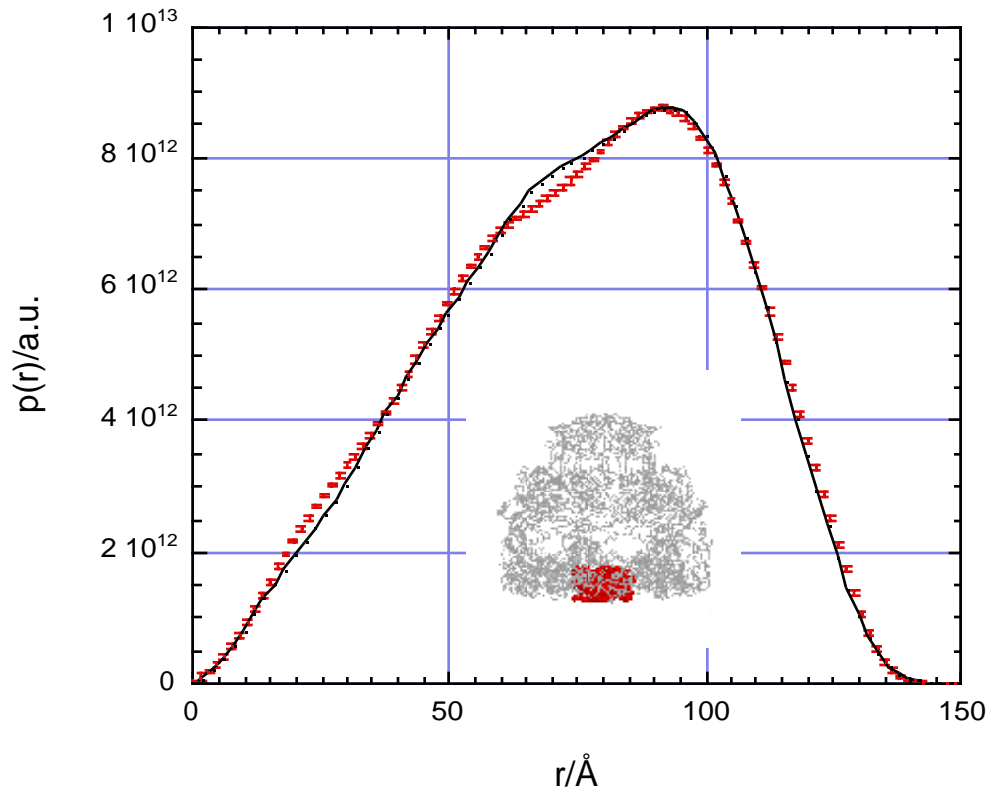


Abb. 2.3: GroEL single ring-GroES-Komplex, Modell (schwarz) und experimentelle Daten (GroEL single-ring und GroES protoniert, mit 3mM ADP in D<sub>2</sub>O-Puffer)

Die Einfügung zeigt das verwendete Modell.

In den früheren SANS-Studien an GroEL-GroES-ADP-Komplexen war in Kontrastausgleichsexperimenten gezeigt worden, daß bei GroES der Bildung dieses Komplexes eine Strukturänderung auftritt. Demzufolge hat GroES in Lösung im ADP-Bullet-Komplex eine andere Konformation, als in der Kristallstruktur.

Die Messung von teildeutertem GroES im Komplex mit ADP und protoniertem, unsichtbarem single-ring GroEL erlaubt in einem analogen Experiment die Untersuchung der Struktur von GroES in situ. Es tritt eine mit diesen früheren Daten vergleichbare Strukturänderung von GroES ein (Abb. 2.4). Die in der  $p(r)$ -Funktion des freien GroES bei den Werten von ca. 20Å bis 40Å sichtbare Schulter verschwindet, wenn es an einen Einzelring gebunden ist.



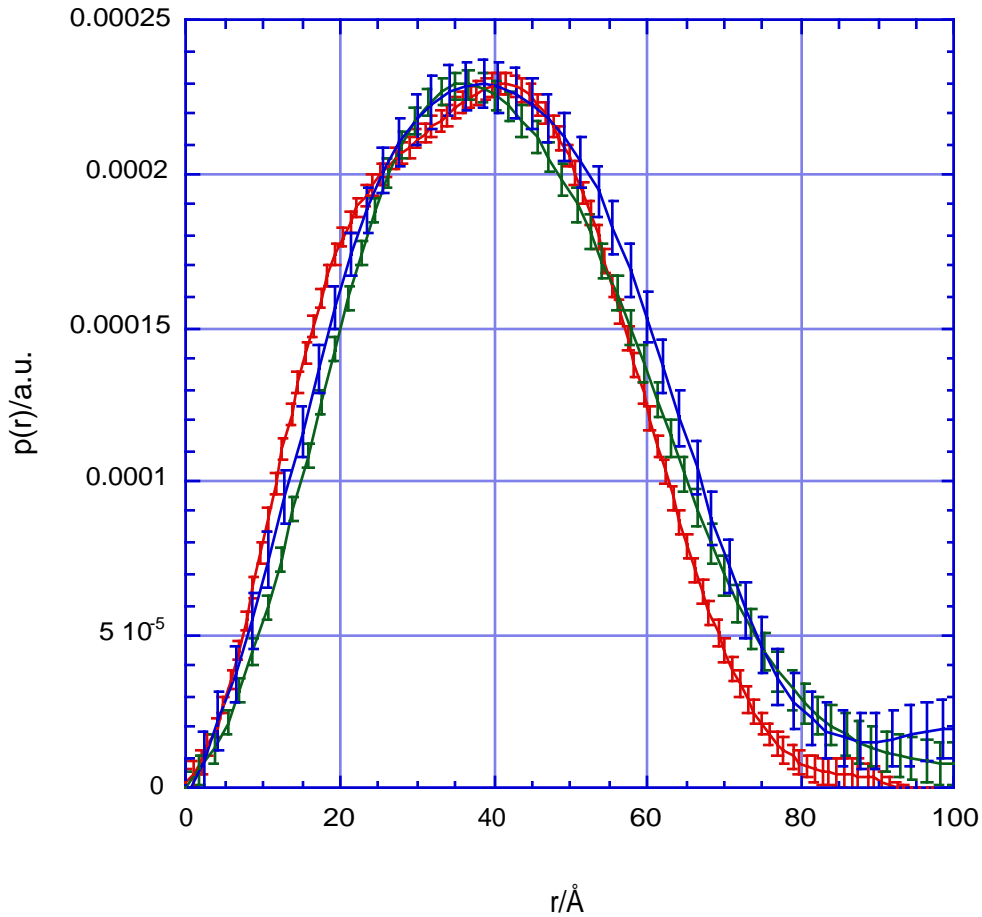


Abb. 2.4: Vergleich von freiem GroES (rot, teildeutert in  $\text{H}_2\text{O}$ -Puffer), GroES in Komplex mit unsichtbarem single-ring-GroEL (grün, teildeutertes GroES, protoniertes single-ring GroEL, 3mM ADP in 40% $\text{D}_2\text{O}$ -Puffer), GroES in Komplex mit unsichtbarem wildtype-GroEL (blau, protoniertes GroES, teildeutertes GroEL, 3mM ADP in  $\text{D}_2\text{O}$ -Puffer)

Die Abstandsverteilungsfunktionen des GroES in situ wurden bis zu Abständen außerhalb der Abbildung gerechnet, diese enthalten aber keine für den Strukturvergleich relevanten Informationen. Leicht positive Werte dürften von einem leichtem Signal von nicht vollständig unsichtbarem GroEL herrühren.

#### *Diskussion:*

Bei den Messungen zur Lösungsstruktur der GroEL single-ring Mutante ergaben sich also keine überraschenden Ergebnisse: die Daten des apo-single-ring wie auch des single-rings im Komplex mit GroES entsprechen Modellkurven der GroEL-Kristallstrukturen ohne den trans-Ring.

Bei der Messung von GroES im Komplex mit gematchtem single-ring GroEL wurde eine Strukturänderung des Co-Chaperonins wie beim Komplex mit wild-type GroEL

(Stegmann et al.) beobachtet. Dies stellt zum einen eine Bestätigung der Ergebnisse an wild-type GroEL dar, zum anderen zeigt es, daß diese Strukturänderung nicht von Interaktionen mit dem trans-Ring abhängt.

### 2.1.3. Titrationsversuche am Football-Komplex

Mit verschiedenen Methoden, vor allem mit EM-Untersuchungen, sind symmetrische Komplexe beobachtet worden, bei denen an beiden Seiten von GroEL jeweils ein GroES bindet (Schmidt et al., Behlke et al., Llorca et al. 1994). Diese werden im allgemeinen Football-Komplexe genannt. Die Bedeutung dieser Komplexe im GroE-Reaktionszyklus ist umstritten. In einigen Arbeiten wird vorgeschlagen, ein Reaktionszyklus mit Football-Komplexe als transientem Zustand hätte einen niedrigeren ADP-Verbrauch, andere Autoren gehen davon aus, daß diese Komplexe ein funktionsloses Nebenprodukt sind (siehe Kapitel 1.1.3).

Football-Komplexe in Lösung geben unter bestimmten Bedingungen sehr charakteristische SANS-Signale. Damit war es uns möglich, durch Untersuchungen über ihre Struktur und Dissoziationskonstanten einen Beitrag zu ihrer besseren Charakterisierung beizutragen. Einfach zu interpretierende Daten von Football-Komplexen erhält man, wenn es gelingt, GroEL zu matchen. In diesem Fall tragen nur noch die beiden GroES-Heptamere zur Streukurve bei, die dann der einer Hantel ähnelt (Abb. 2.5).

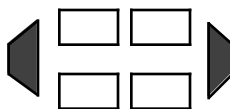


Abb. 2.5: Schematische Darstellung eines symmetrischen GroEL-GroES-Komplexes mit unsichtbarem GroEL in einem Kontrastausgleichsexperiment

Die Hantelkonfiguration kann erreicht werden, indem Komplexe aus protoniertem GroEL und deuteriertem GroES gemessen werden, wobei der Kontrast von GroEL durch die Verwendung eines Puffers mit 40% D<sub>2</sub>O ausgeglichen wird. Alternativ kann teildeuteriertes GroEL zusammen mit protoniertem GroES gemessen werden (Matchpunkt von GroEL in 99% D<sub>2</sub>O, siehe Kapitel 2.1.1).

In der Literatur werden Football-Komplexe in Anwesenheit von ATP und AMP-PNP beschrieben. In Vorversuchen wurde daher die Bildung von Komplexen qualitativ untersucht (Abb. 2.6). Bei diesen Versuchen wurde volldeuteriertes GroEL mit protoniertem GroES eingesetzt (deuteriertes GroES war zu diesem Zeitpunkt nicht verfügbar). Diese Konstellation erlaubt es nicht, eine reine Hantelstruktur zu beobachten, da GroEL nicht völlig unsichtbar ist. Da das protonierte Protein einen negativen und das deuterierte einen positiven Kontrast hat, kann eine Bindung zwischen GroEL und GroES durch einen negativen Interferenzterm in der  $p(r)$ -Funktion nachgewiesen werden. Ein Football-Komplex zeigt sich im Auftreten von positiven Werten für große Abstände.

Unsere Daten zeigen die Bildung von Football-Komplexen in Anwesenheit des nicht hydrolysierbaren ATP-Analogs AMP-PNP, jedoch nicht bei der Probe mit ATP. Auch in anderen Kontrastbedingungen konnten nur in Gegenwart von AMP-PNP symmetrische Komplexe nachgewiesen werden. Die weitere Darstellung beschränkt sich daher auf GroEL-GroES-AMP-PNP-Komplexe.

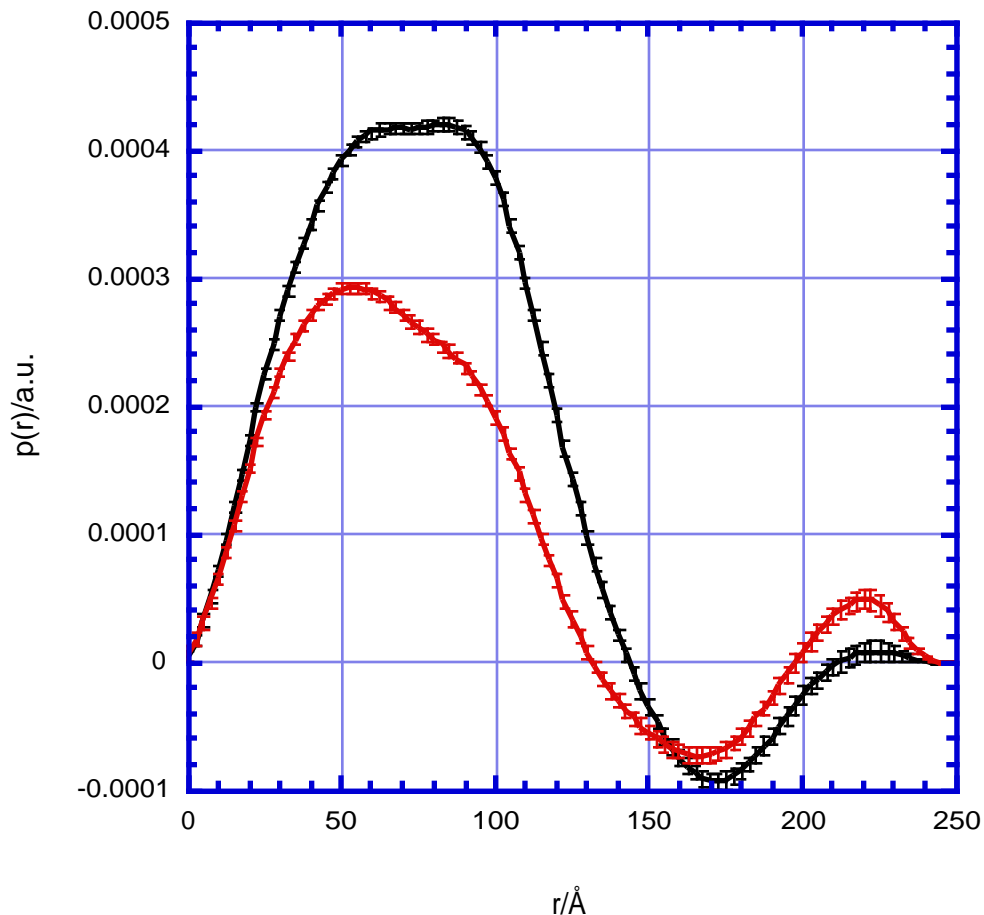


Abb. 2.6: volldeutiertes GroEL mit protoniertem GroES im Verhältnis 1:1 in D<sub>2</sub>O-Puffer  
 schwarz: mit ATP (3mM) rot: mit AMP-PNP (30mM)  
 Konzentration GroEL und GroES: jeweils etwa 12,5  $\mu$ M

Die weiteren Messungen wurden mit Komplexen aus protoniertem, gematchtem GroEL und dem mittlerweile zur Verfügung stehenden deuterierten GroES in 40% D<sub>2</sub>O vorgenommen. Bei diesen Versuchen zeigten sich tatsächlich  $p(r)$ -Funktionen mit einer starken Ähnlichkeit zu Hantelstrukturen (Abb. 2.8). Der erste Peak entspricht dem Eigenterm eines GroES-Heptamers. Aussagen über die Form des Co-Chaperonins lassen

sich dabei kaum machen: bei einer Struktur wie dem Football-Komplex haben die für die indirekte Fouriertransformation verwendeten Beta-Splines nicht mehr viel Freiheit, um Feinheiten der Streukurve nachvollziehen zu können. Der zweite Peak entspricht dem Interferenzterm zwischen den beiden GroES-Heptameren. In der Mitte der Kurve gehen die Werte der  $p(r)$ -Funktion nicht vollständig auf Null zurück. Dies weist darauf hin, daß GroEL nicht ganz gematcht bzw. der Puffer etwas zu niedrig deuteriert ist.

In der Streukurve manifestiert sich die Hantelstruktur in Form einer Oszillation mit einer Periode von etwa  $0.04\text{\AA}^{-1}$ , die vor allem im Anfangsteil der Streukurve sichtbar ist (siehe Pfeile in Abb. 2.8). Die  $p(r)$ -Funktion zeigt, daß GroEL nicht vollständig gematcht ist. Nach Modellrechnungen enthält der Puffer etwas weniger als 40%  $\text{D}_2\text{O}$ . Experimentelle Streukurve und Modellkurve treffen sich am besten, wenn man von 38%  $\text{D}_2\text{O}$  im Puffer ausgeht.

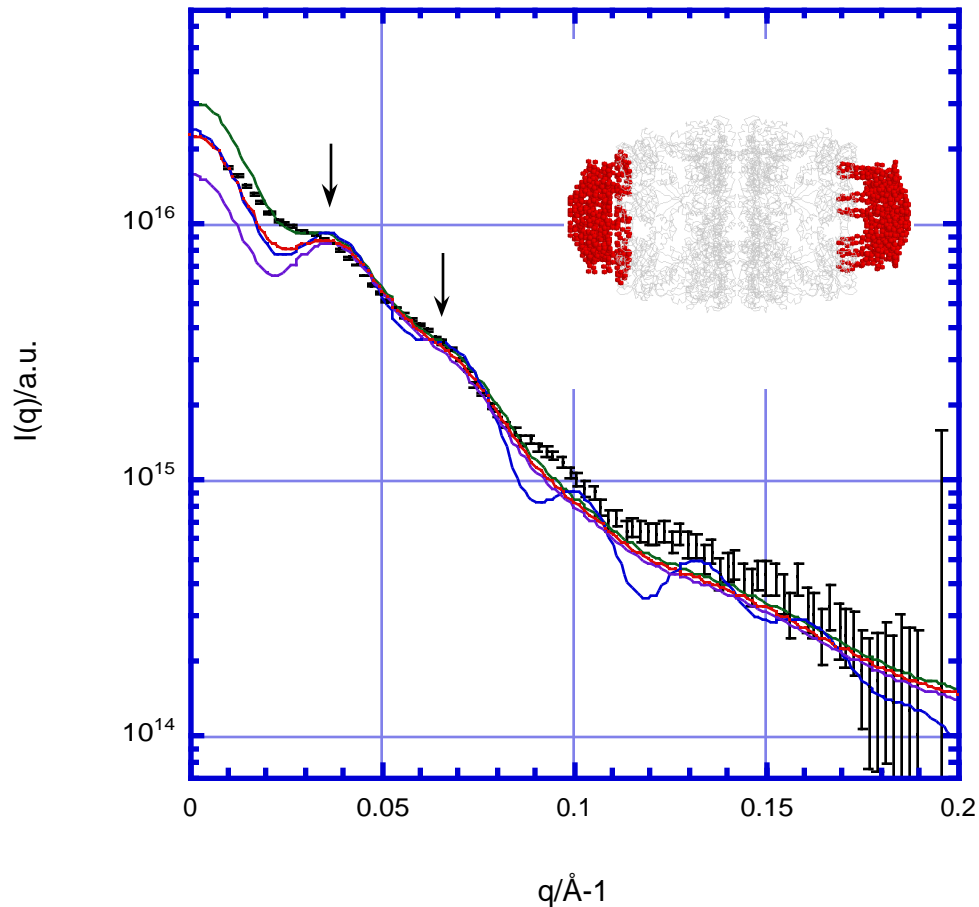


Abb. 2.7: Football-Komplex, experimentelle Daten und Modelle  
 schwarz: protoniertes GroEL mit deuteriertem GroES Verhältnis 1:2 in 40% D<sub>2</sub>O-Puffer, 30mM AMP-PNP, Gesamtkonzentration 10mg/ml  
 Modellkurven: in allen Fällen Modell eines asymmetrischen Football-Komplex (Einfügung)  
 grün: verschmiert, 38% D<sub>2</sub>O-Puffer  
 rot: verschmiert, 40% D<sub>2</sub>O-Puffer  
 blau: unverschmiert, 40% D<sub>2</sub>O-Puffer  
 violett: verschmiert, 42% D<sub>2</sub>O-Puffer

Für eine genauere Modellierung wurden drei Modelle betrachtet:

Zum einen wurde ein cis-Ring von GroEL aus der Kristallstruktur zusammen mit GroES an der Ebene zwischen dem cis- und dem trans-Ring gespiegelt (Einfügung Abb. 2.8, Mitte).

Für die beiden anderen Modelle wurden entweder einer (Einfügung Abb. 2.8, links) oder beide GroES-Ringe (Einfügung Abb. 2.8, rechts) durch die des SANS-Modells ersetzt.

Für alle Modellkurven wurde außerdem angenommen, daß sich 35% des GroES nicht in Football-Komplexen gebunden ist. Diese Größe geht aus der Differenz zwischen Eigenterm und Interferenzpeak der entsprechenden  $p(r)$ -Funktion in Abb. 2.9 hervor.

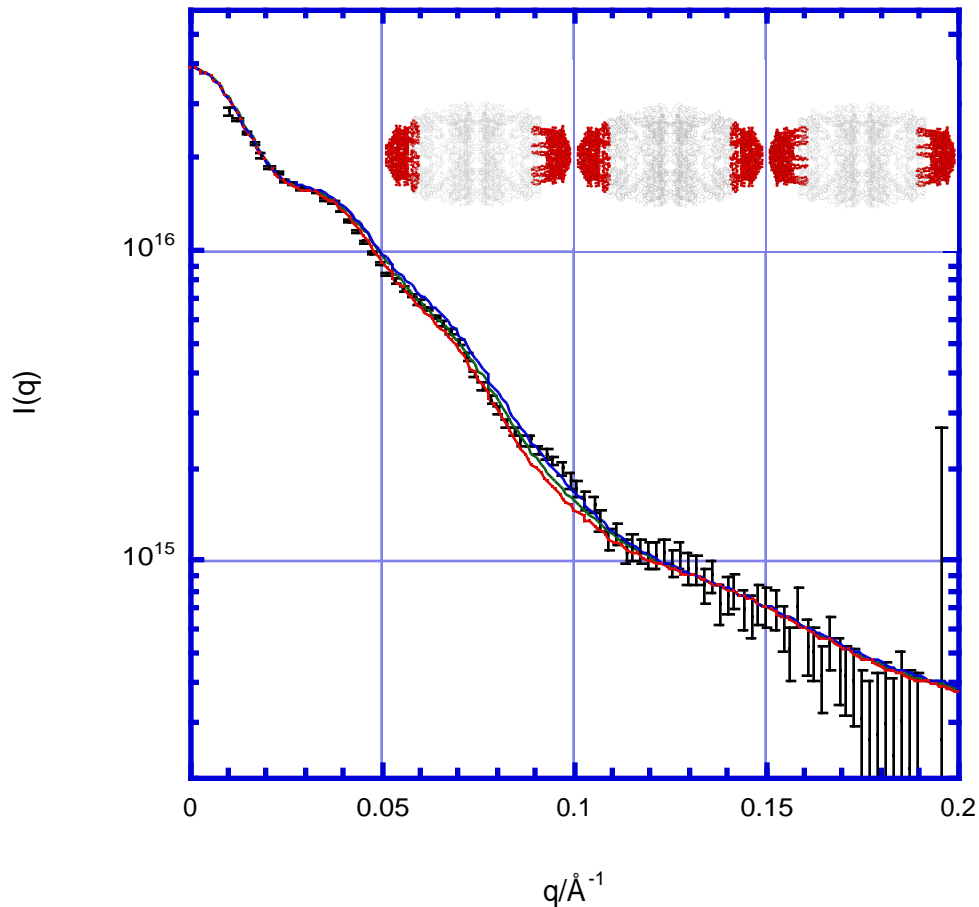


Abb. 2.8: Football-Komplex, experimentelle Daten und Modelle  
 schwarz: protoniertes GroEL mit deuteriertem GroES Verhältnis 1:2 in 40%  $D_2O$ -Puffer, 30mM AMP-PNP, Gesamtkonzentration 10mg/ml  
 Modellkurven: Alle drei Modellkurven gehen von einem 38%  $D_2O$ -Puffer und 35% freiem GroES aus und sind verschmiert.  
 grün: asymmetrisch (Einfügung, links)  
 rot: GroES aus Kristallstruktur (Einfügung, Mitte)  
 blau: GroES aus SANS-Modell (Einfügung, rechts)

Unter diesen Voraussetzungen fitten alle drei Modelle die Daten relativ gut, das asymmetrische Modell scheint der experimentellen Kurve am nächsten zu sein.

Innerhalb der Fehlergrenzen entsprach der Abstand zwischen den beiden GroES-Heptameren (200Å zwischen den Schwerpunkten, wie in der Kristallstruktur) den experimentellen Daten.

Aus der  $p(r)$ -Funktion lässt sich das Verhältnis der Konzentration von Football-Komplex zur gesamten GroES Konzentration ablesen: sie entspricht dem Verhältnis der Fläche des Interferenzpeaks zur Fläche des peaks des Eigenterms. Wäre GroES zu 100% in symmetrischen Komplexen gebunden, müssten also die Flächen identisch sein.

Eine Titrationsreihe zwischen GroEL und GroES erlaubte uns, die Dissoziationskonstante von GroES im Football-Komplex abzuschätzen (Abb. 2.9).

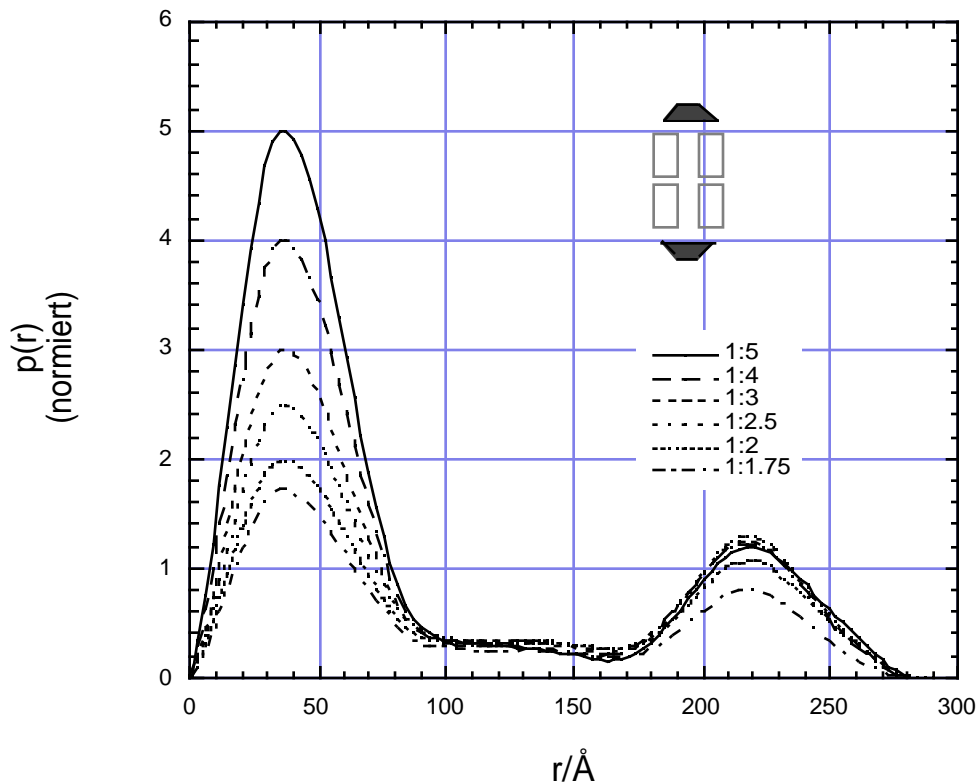


Abb. 2.9: protoniertes GroEL mit deuteriertem GroES und AMP-PNP in 40% D<sub>2</sub>O –Puffer, Titration mit verschiedenen GroEL:GroES Verhältnissen, Konzentration GroEL jeweils 10mg/ml  
Bei den Verhältnissen werden jeweils Konzentrationen von GroEL-14-meren und von GroES-7-meren gegenübergestellt.

Als Basis der Dateninterpretation müssen einige theoretische Überlegungen zur Unterscheidung des freien GroES und des im Bullet-Komplex gebundenen GroES durchgeführt werden:

Der asymmetrische GroEL-GroES-AMP-PNP Komplex bildet sich nach Literaturdaten sehr schnell und ist sehr stabil (Assoziationskonstante  $k_a \sim 5 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , Dissoziationskonstante  $k_d \sim 3.5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ , Halbwertszeit  $t_{1/2} \sim 4$  Stunden, Hayer-Hartl, 1995). Von unserer Gruppe an GroEL-GroES-ADP Komplexen durchgeführte zeitaufgelöste Messungen (Rößle, JAC, 2000, Holzinger, vorliegende Arbeit, Kapitel 2.2.1) kommen auf ähnliche Werte. Mit Gelelektrophorese konnten bei einem Konzentrationsverhältnis von 1:1 kein freies GroEL oder GroES mehr nachgewiesen werden (Abb. 2.10).

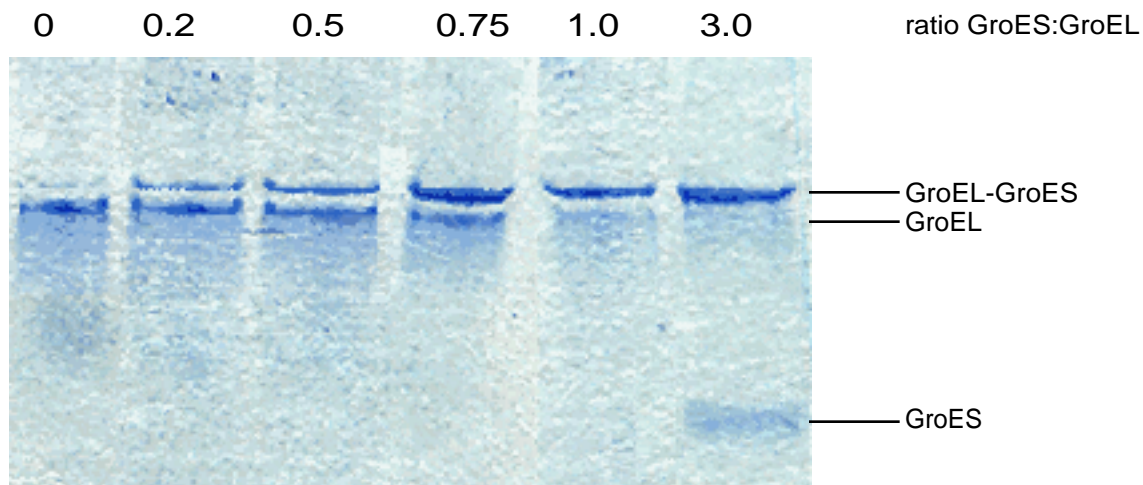


Abb. 2.10: Gelelektrophorese einer Titration zwischen GroES und GroEL

Demzufolge kann bei den von uns verwendeten Konzentrationen (10mg/ml,  $1.25 \times 10^{-5} \text{M}$ ) davon ausgegangen werden, daß bei einem GroEL-GroES-Verhältnis von 1:1 praktisch fast alles Protein in Komplexen vorliegt. Bei der Interpretation der Titrationsdaten kann also die Bildungsreaktion des Bullet-Komplexes aus freiem GroEL und GroES vernachlässigt werden.

In der folgenden Diskussion werden zur besseren Übersicht die folgenden Abkürzungen verwendet:

L = freies GroEL Tetradekamer

S = freies GroES Heptamer

LS = GroEL-GroES1:1-Komplex

LS<sub>2</sub> = GroEL-GroES1:2-Komplex

L<sub>T</sub> = Gesamtkonzentration von GroEL, frei und in Komplexen (t steht für total)

S<sub>T</sub> = Gesamtkonzentration von GroES, frei und in Komplexen

Die Bildung des Football-Komplexes aus Bullet-Komplex und GroES läßt sich dann mit folgender Gleichung beschreiben:

$$k_1 LS \cdot S = k_{-1} L \cdot LS_2$$

oder

$$k_D = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{LS \cdot S}{LS_2} \quad (2.1)$$



Bei einer konstanten, bekannten Konzentration von GroEL und einer bekannten Konzentration von GroES kann unter Zuhilfenahme zweier einfacher Annahmen nicht nur die Konzentration von Football-Komplexen, sondern auch die von freiem GroEL und GroES sowie von Bullet-Komplexen bestimmt werden.

- Ab einem molaren Verhältnis zwischen GroEL und GroES von  $\leq 1$  ist GroEL vollständig in Komplexen gebunden.
- Bei einem molaren Verhältnis zwischen GroEL und GroES von  $\leq 1$  ist GroEL also entweder in Football-Komplexen oder in Bullet-Komplexen gebunden.

Aufgrund der oben genannten Voraussetzungen gilt also:

$$LS + LS_2 = L_T \quad \text{bzw.} \quad LS = L_T - LS_2 \quad (2.2) \quad \text{und}$$

$$S + LS + 2(LS_2) = S_T \quad (2.3)$$

Gleichung 2.1 ist äquivalent zu

$$S = k_D \cdot \frac{LS_2}{LS}$$

Setzt man dies in 2.3 ein, ergibt sich

$$k_D \cdot \frac{LS_2}{LS} + LS + 2(LS_2) = S_T$$

Hier kann LS gemäß 2.2 ersetzt werden:

$$k_D \cdot \frac{LS_2}{L_T - LS_2} + L_T - LS_2 + 2(LS_2) = S_T$$

$$\Rightarrow k_D \cdot \frac{LS_2}{L_T - LS_2} + L_T + LS_2 = S_T$$

$$\Rightarrow k_D LS_2 + L_T(L_T - LS_2) + LS_2(L_T - LS_2) = S_T(L_T - LS_2)$$

$$\Rightarrow k_D LS_2 + L_T^2 - LS_2 L_T + LS_2 L_T - LS_2^2 = S_T L_T - S_T LS_2$$

$$\Rightarrow k_D LS_2 + L_T^2 - LS_2^2 = S_T L_T - S_T LS_2$$

$$\Rightarrow L_T^2 - S_T L_T = L S_2^2 - S_T L S_2 - k_D L S_2$$

$$\Rightarrow L_T^2 - S_T L_T + \left(\frac{1}{2}(S_T + k_D)\right)^2 = L S_2^2 - (S_T + k_D) L S_2 + \left(\frac{1}{2}(S_T + k_D)\right)^2$$

$$\Rightarrow L_T^2 - S_T L_T + \frac{1}{4} S_T^2 + \frac{1}{2} S_T k_D + \frac{1}{4} k_D^2 = (L S_2 - \frac{1}{2} (S_T + k_D))^2$$

$$\Rightarrow L S_2 = \frac{1}{2} S_T + \frac{1}{2} k_D - \sqrt{L_T^2 - S_T L_T + \frac{1}{4} S_T^2 + \frac{1}{2} S_T k_D + \frac{1}{4} k_D^2} \quad (2.4)$$

(Die Lösung mit positivem Vorzeichen vor der Quadratwurzel wäre nicht sinnvoll in diesem Fall würde man bei unendlicher Konzentration an GroES eine unendliche Menge an Footballkomplexen finden. Bei einem negativen Vorzeichen vor der Quadratwurzel ist nähert sich die Konzentration an Footballkomplexen der von GroEL, was der Realität entspricht.)

Abb. 2.11 zeigt einen Fit der Daten nach diesem Modell.

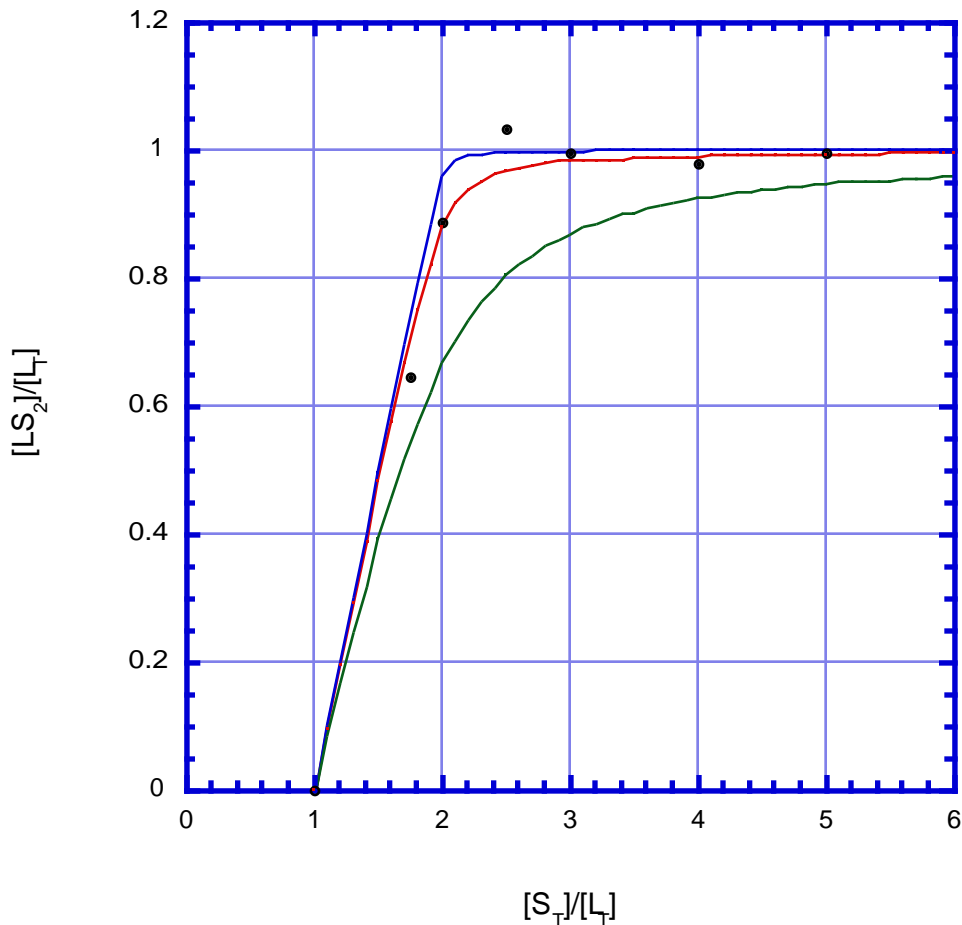


Abb. 2.11: relative Konzentration an Football-Komplexen gegen relative Konzentration an GroES

schwarz: experimentelle Datenpunkte

rot: Fit nach Gleichung 2.4 ( $k_D=2 \cdot 10^{-7} \text{M}$ )

blau: theoretische Kurve nach Gleichung 2.4 mit um den Faktor 10 schwächerem  $k_D$  als im Fit

grün: theoretische Kurve nach Gleichung 2.4 mit um den Faktor 10 stärkerem  $k_D$  als im Fit

Nach diesem Fit hätte das zweite GroES-Molekül im Football-Komplex eine Dissoziationskonstante von  $2 \cdot 10^{-7} \text{M}$ . Zum Vergleich gerechnete Kurven um den Faktor 10 größeren oder kleineren Dissoziationskonstanten sind deutlich von den gemessenen Punkten entfernt.

In Kontrollexperimenten mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden in allen Proben sowohl einzelne GroEL- und GroES-Oligomere als auch Bullet- und Football-Komplexe gefunden (Abb. 2.12). Eine Quantifizierung war wegen einer hohen Konzentration von Aggregaten, eines „GroES-Rasens“ im Hintergrund und des Auftretens von „Top-views“

nicht möglich. Letzteres sind GroEL-Tetradekamere oder Bullet-Komplexe, die auf eine offene Seite des Hohlzylinders fallen, in der Aufnahme von oben zu sehen sind und damit nur schwer unterschieden werden können.

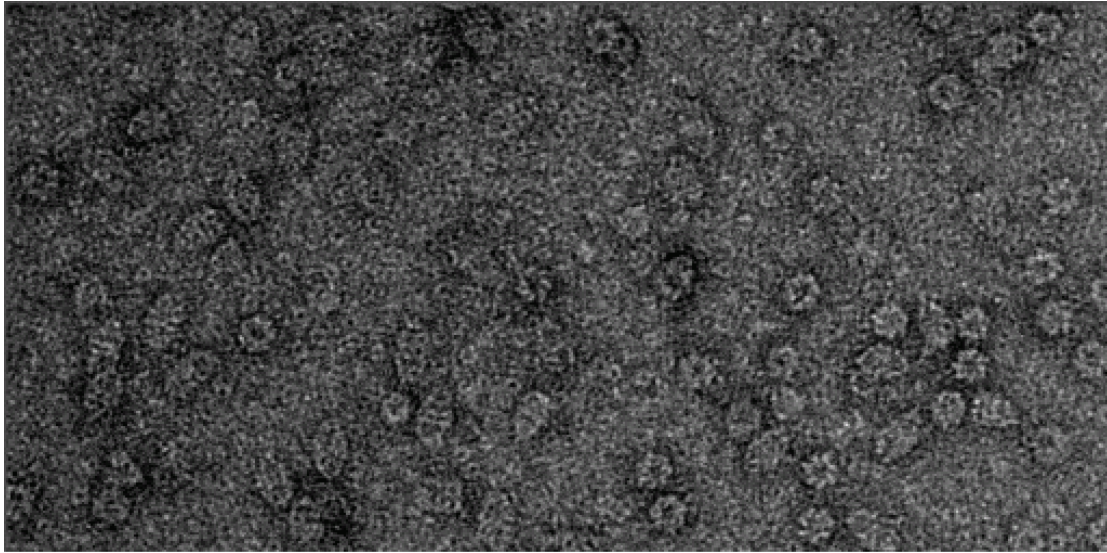


Abb. 2.12: EM-Aufnahme einer GroEL/GroES/AMP-PNP Probe mit „Top-views“, GroEL-Tetradekameren, Bullet-Komplexen und Football-Komplexen (I. Gutsche)

Abgesehen von diesen Schwierigkeiten bei der Quantifizierung sind die Bedingungen mit denen der SANS-Versuche nicht direkt vergleichbar: zum einen wurde nicht derselbe Puffer verwendet, zum anderen wurden die Proben kurz vor dem Einfrieren verdünnt.

#### *Diskussion:*

Die beschriebenen Experimente zeigen, daß mit Hilfe von SANS sehr einfach Football-Komplexe nachgewiesen werden können, wenn man über deuteriertes GroEL oder GroES verfügt. In unserem Fall gelang der Nachweis von Football-Komplexen in Anwesenheit des ATP-Analogons AMP-PNP, aber nicht in Anwesenheit von ATP wie in anderen in der Literatur beschriebenen Experimenten (Behlke, Schmidt).

Eine Erklärung wäre die durch die sofortige Hydrolyse von ATP bedingte kurze Überlebenszeit von ATP-Football-Komplexen. Die Frage zwischen dem Unterschied zwischen Komplexen mit ATP und AMP-PNP sollte also in weiteren Experimenten untersucht werden.

Bei den Experimenten in 40% D<sub>2</sub>O ist das protonierte GroEL gematcht; deswegen kann natürlich keine Aussage über seine Struktur gemacht werden. Genauere Informationen über die Konformation des deuterierten GroES sind schwierig, da bei allen Proben Gemische aus Bullet-Komplexen, Football-Komplexen und freiem GroES vorliegen. Außerdem ist nicht klar, ob die Struktur der beiden GroES-Heptamere im Football-Komplex identisch ist. Trotz dieser Einschränkungen verglichen wir die Streukurve des Football-Komplex mit verschiedenen Modellkurven. Der experimentellen Kurve am nächsten kommt ein Modell, bei dem auf einer Seite des Komplexes GroES mit der

Konformation der Kristallstruktur gebunden ist und auf der anderen Seite GroES in der Konformation des SANS-Modells. Die zuverlässigste Strukturinformation der  $p(r)$ -Funktionen ist die Entfernung zwischen den zwei GroES-Heptameren im Football-Komplex. Diese Zahl entspricht einem Modell aus zwei cis-Seiten eines GroEL-GroES-ADP-Komplexes. Die beobachtete Übereinstimmung der GroEL-GroES-Abstände in Bullet-Komplex und Football-Komplex (jeweils 100Å) ist keine Selbstverständlichkeit, da in den beiden Strukturen verschiedenen Konformation von GroEL auftreten müssen.

Aussagen über die Form der GroES-Moleküle sind schwieriger, da in den Proben auch GroES vorkommt, das nicht in Football-Komplexen gebunden ist. Bei der Modellierung ist also zu berücksichtigen, daß es sich um eine Mischung verschiedener Strukturen handelt. Unter diesen Voraussetzungen wurden Modellstreukurven von mehreren Strukturen auf der Basis bekannter GroES-Konformationen (Bullet-Komplex im Kristall und in Lösung) berechnet. Ein Modell mit jeweils einer der beiden GroEL-Konformationen an den beiden Enden von GroEL führte zur besten Annäherung an die gemessenen Daten. Dies untermauert die Vermutung, daß der Football-Komplex in vivo nicht nur funktionell und in Bezug auf die Nukleotidbesetzung pseudosymmetrisch ist, sondern auch strukturell. Theoretisch wäre es allerdings auch denkbar, daß beide GroES-Heptamere eine identische dritte Konformation einnehmen, die von beiden in Bullet-Komplex gefunden Strukturen verschieden ist.

Der Vergleich der Flächen des ersten und zweiten Peaks in den  $p(r)$ -Funktionen erlaubt eine Abschätzung des in Football-Komplexen gebunden GroES mit der GroES-Gesamtkonzentration. Ausgehend von diesen Daten ermittelten wir die Dissoziationskonstante des zweiten GroES-Heptamers im Football-Komplex mit einem Wert von  $2 \cdot 10^{-7} \text{M}$ . Eine Modellrechnung zeigt, daß der Fehler dieser Größe nach unten etwa eine Größenordnung beträgt, nach oben ist die Genauigkeit wesentlich besser.

Es stellt sich die Frage, inwieweit diese Ergebnisse mit AMP-PNP auf den ATP-Komplex übertragbar sind. In den Modellen für GroE-Reaktionszyklen unter Einschluß des Football-Komplex wird davon ausgegangen, daß dieser nur einen Ring mit ATP besetzt hat, der andere Ring hätte ADP gebunden (z.B. Grallert et al.). Dieses Modell ergibt sich zum einem aus der Einordnung des Football-Komplex in den Reaktionszyklus, zum anderen erscheinen Football-Komplexe mit zwei ATP-Ringen wegen der ausgeprägten Inter-Ring-Antikooperativität der ATP-Bindung als extrem unwahrscheinlich. Mehrere Experimente deuten jedoch darauf hin, daß die ATP-Analoga ATP $\gamma$ S und AMP-PNP in ihrem Kooperativitätsverhalten eher ADP als ATP ähneln (Yifrach et al., 1998, Inobe et al., 2001). Demzufolge dürfte die Dissoziationskonstante der AMP-PNP-Komplexe also dem Wert der ATP-ADP-Komplexen nahekommen.

Die bei einer GroEL-GroES-Verhältnis von 1:2 gefundene hohe Konzentration an Football-Komplexen ist ein Indiz für deren in vivo-Relevanz. Da die beiden Proteine von einem Promotor kontrolliert werden, werden sie in der Zelle in einem Verhältnis von 1:2 exprimiert und erreichen Konzentrationen, die mit denen unserer Experimente vergleichbar sind.

Abgesehen von der zum System GroE gewonnenen Information konnten wir demonstrieren, wie mit Hilfe von Neutronenstreuung und Kontrastvariation Dissoziationskonstanten gemessen werden können. Das hauptsächliche Hindernis hierbei

ist die Deuterierung eines Teil des Komplexes. Ist dieses Problem gemeistert, ist die eigentliche Messung und ihre Interpretation relativ einfach.

#### **2.1.4. statische Versuche am Co-Chaperonin GP31**

Die Entwicklung eines eigenen Co-Chaperonins muß für den Phagen T4 ein erheblicher evolutionärer Aufwand gewesen sein. Zudem kompliziert jedes weitere von der Wirtszelle zu exprimierende Protein den Zyklus des Phagen. GP31 muß also einen wichtigen funktionellen Unterschied zu GroES aufweisen. Laut theoretischen Erwägungen auf der Basis der Kristallstruktur könnten die bei GP31 längeren „mobile loops“ zu einer Vergrößerung des Innenraums im asymmetrischen Komplex führen, und damit mehr Platz für die Faltung von des mit 56kDa relativ großen GP23 lassen (Hunt, et al., 1997). Diese These konnte allerdings bisher nicht experimentell untermauert werden. Da SANS mit gematchtem GroEL mehrere interessante Experimente zu diesem System ermöglicht, versuchten wir, einen Beitrag zur Suche nach den entscheidenden Unterschieden zwischen den beiden Co-Chaperoninen zu leisten.

Die Untersuchungen beinhalteten

- einen Strukturvergleich der beiden Co-Chaperonine in Lösung
- einen Vergleich des strukturellen Verhaltens bei der Bindung an GroEL
- Vergleiche von aus GroEL mit GroES bzw. GP31 gebildeten Football-Komplexen und schließlich
- kinetische Untersuchungen zum Vergleich des Bindungsverhaltens beider Proteine (siehe Kapitel 2.2.1).

Zunächst betrachteten wir die Struktur der beiden Apo-Co-Chaperonine in Lösung. Aus unseren Daten läßt sich kein beachtlicher Unterschied ableiten (Abb. 2.13). Geringe Abweichungen zwischen den Strukturen, wie hier zu sehen, waren zu erwarten, da Proteine mit unterschiedlicher Masse natürlich keine identische Struktur haben können.

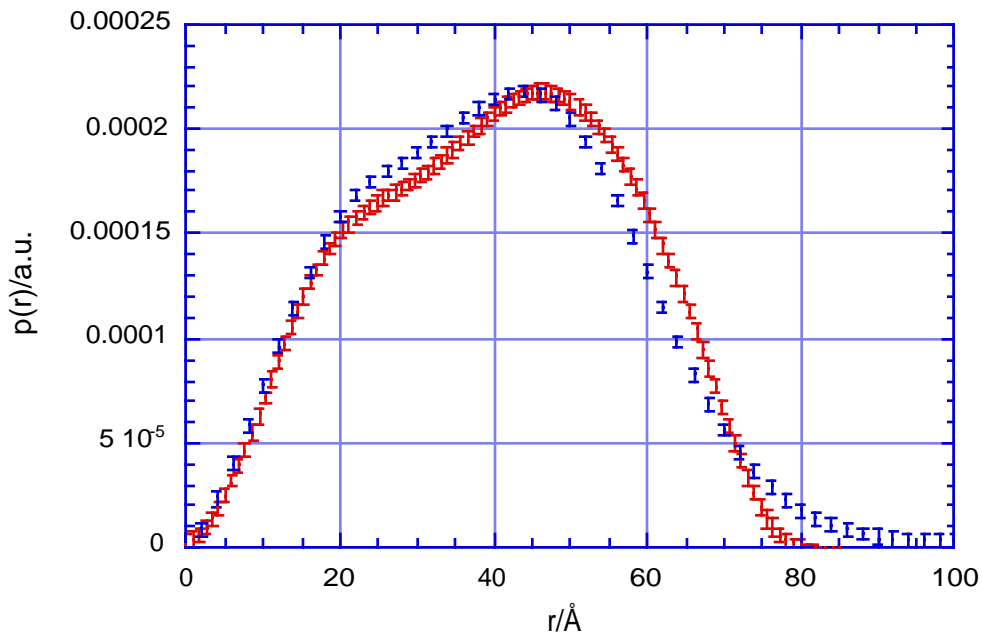


Abb. 2.13: Abstandsverteilungsfunktionen von GroES (blau) und GP31 (rot) in Lösung

Die nächste und wichtigere Frage war, ob sich bei der Bindung am GroEL Unterschiede bei den Strukturänderungen ergeben würden. Hierzu wurden Streukurven von asymmetrischen GroEL-GP31-ADP Komplexen mit unsichtbarem GroEL gemessen. Auch hier war jedoch ein ähnliches Verhalten der beiden Co-Chaperonine zu beobachten: GP31 änderte seine Struktur bei der Bindung an GroEL (Abb. 2.14). Abweichungen von der Nulllinie im rechten Teil der Streukurve dürften an leichten Aggregationseffekten und einem leichten Verfehlen des Matchpunktes liegen.

SANS-Experimente mit asymmetrischen GroEL-GP31-ATP Komplexen sind nicht sinnvoll, da während der langen Meßzeit einer Kurve das ATP hydrolysiert würde. Eine Lösung dieses Problems ist die Zugabe von  $\text{BeF}_x$  (einer schwer genauer zu bestimmende Mischung Be-F-Verbindungen) in eine Probe mit ADP; dabei entstehen nicht hydrolysierbare ATP-analoge Verbindungen.

Diese Zugabe von  $\text{BeF}_x$  zu den Komplexen führte jedoch zu keiner Konformationsänderung innerhalb der Meßgenauigkeit der Kleinwinkelstreuung. Auf eine Darstellung dieser Daten wird hier verzichtet, nachdem sie im Rahmen der Fehlergrenzen mit der Kurve aus Abb. 2.14 identisch sind.

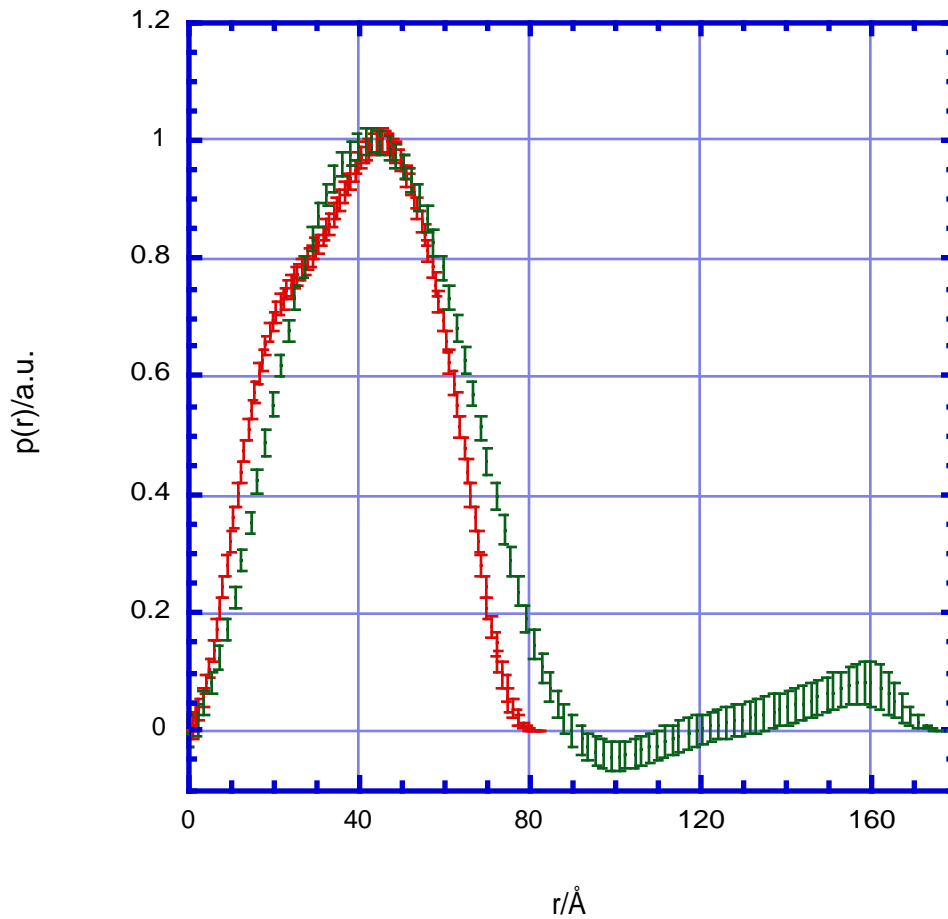


Abb.2.14: Strukturänderung von GP31 in Komplex mit GroEL

rot: protoniertes GP31 in 99% D<sub>2</sub>O –Puffer

grün: protoniertes GP31 mit teildeutertem GroEL und ADP in 97% D<sub>2</sub>O –Puffer

Ein nächster Schritt war die Untersuchung der Struktur von Football-Komplexen aus unsichtbarem GroEL und GP31.



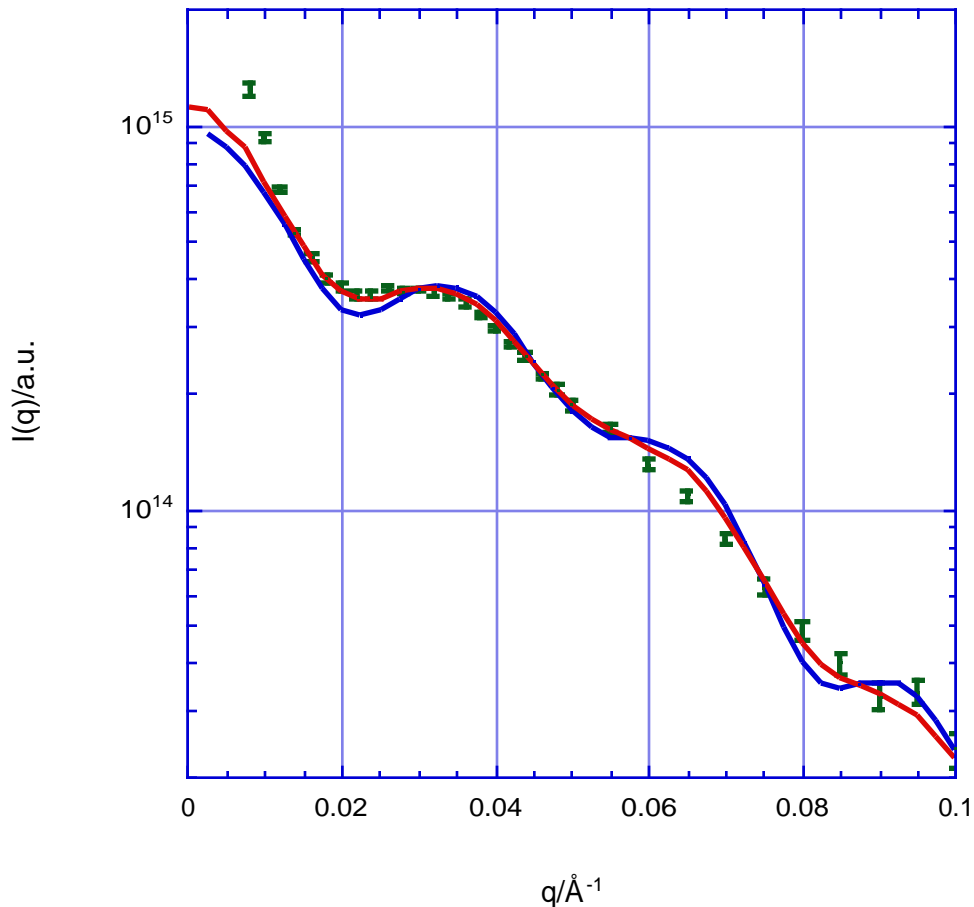


Abb. 2.15: GP31-Football-Komplex:  
 teildeutertes GroEL mit protoniertem GroES und AMP-PNP in 99% D<sub>2</sub>O (grün), experimentelle Daten  
 unverschmierte Modellstreucurve, Schwerpunktsabstand zwischen den beiden GP31-Heptameren 210Å (blau)  
 verschmierte Modellstreucurve, Schwerpunktsabstand zwischen den beiden GP31-Heptameren 210Å (rot)

Die Streukurven weisen, etwa in den ersten drei Punkten, auf leichte Aggregationseffekte hin (Abb. 2.15). Die Anwesenheit einer Hantelstruktur führt zu einer deutlich sichtbaren Oszillation. Die Kurve kommt den Daten eines Modell mit einem Abstand von 210Å zwischen den beiden Schwerpunkten der GP31-Oligomere sehr nahe.

In der  $p(r)$ -Funktion (Abb. 2.16) ist die Hantelstruktur aufgeprägter als in allen Versuchen mit GroES (man betrachte die Flächenverhältnisse der peaks von Eigenterm und Interferenzterm). Den Flächen der peaks nach zu urteilen, muß fast das gesamte GP31 an GroEL gebunden sein. Man sieht, daß die Schwerpunkte der beiden GP31-Heptamere etwa 10Å weiter voneinander entfernt sind als die von zwei GroES-Heptameren. Eine genaue Untersuchung der Daten zeigte, daß dieser

Schwerpunktsabstand nicht durch die Aggregationen verfälscht wurde (siehe Kapitel 4.5).

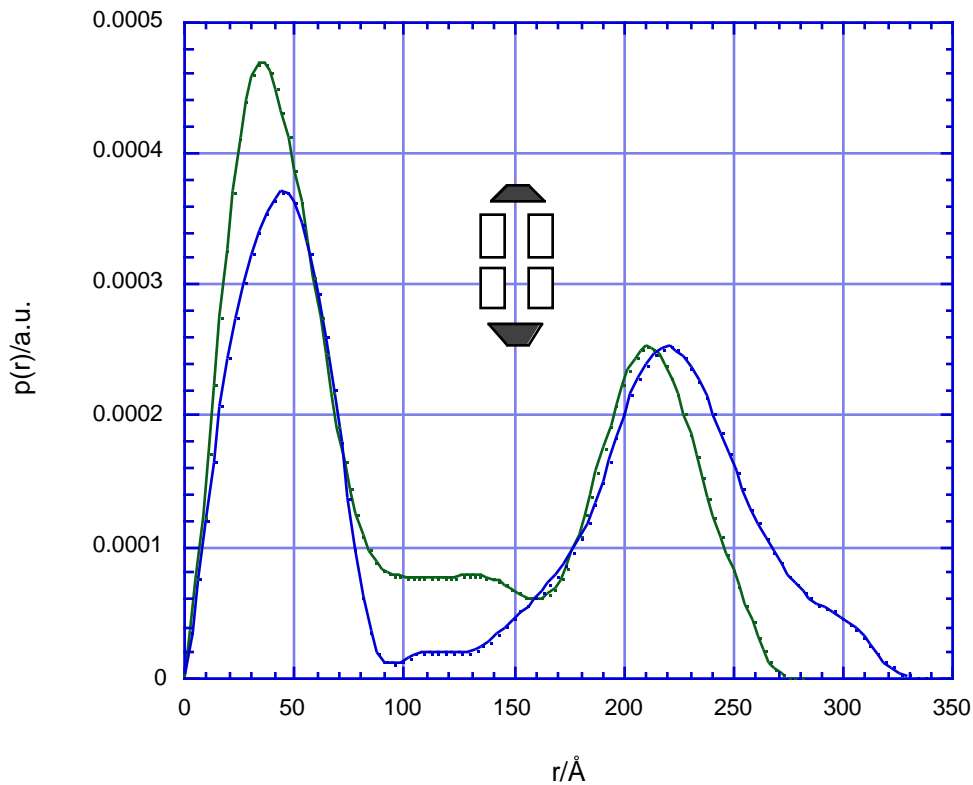


Abb. 2.16: Football-Komplexe mit gematchtem GroEL:  
protoniertes GroEL mit volldeutertem GroES und AMP-PNP in 40% D<sub>2</sub>O (grün)  
teildeutertes GroEL mit protoniertem GroES und AMP-PNP in 99% D<sub>2</sub>O (blau)

#### *Diskussion:*

Der Vergleich der Lösungsstrukturen von GroES und GP31 hat gezeigt, daß diese zwar sehr ähnlich, aber nicht identisch sind. Nach den bekannten Ergebnissen über Sequenzen und Kristallstrukturen war dies zu erwarten: GP31 ist etwas größer, als GroES, hat aber eine sehr ähnliche Form.

Mit der zu GroES analogen Strukturänderung im ADP-Bullet Komplex wurde ein weiterer Beleg für das fast identische Verhalten der Co-Chaperonine auch beim allosterischen Verhalten erbracht.

Die Daten des aus gematchten GroEL und sichtbarem GP31 geformten Football-Komplexes erlauben dagegen eine Erklärung für die Notwendigkeit der Expression eines speziellen Co-Chaperonins für den Zyklus des Phagen T4:

Im mit AMP-PNP geformten Football Komplex sind die beiden GP31-Heptamere etwa 10 Å weiter voneinander entfernt, als in seinem mit GroES geformten Analogon. Damit

dürften die Hohlräume zwischen GroEL und GP31 jeweils etwa 5Å höher sein als bei Komplexen mit GroES. Eine genaue Volumenabschätzung ist nicht möglich, da die Information fehlt, ob sich eventuell die Struktur von GroEL ändert. Es ist jedoch davon auszugehen, daß die Höhlung für die Proteinfaltung größer ist und damit auch etwas größere Proteine, speziell das Phagenprotein GP23 gefaltet werden können.

Das Verhältnis der Flächen des Eigenterms der Co-Chaperonine (die jeweils ersten peaks in der  $p(r)$ -Funktion) und der Interferenzterme ist im Fall von GP31 größer. Es scheint also ein größerer Teil des Co-Chaperonins in Football-Komplexen gebunden zu sein. Dies ist ein Hinweis auf unterschiedliche Bindungskonstanten.

Der erste peak in den  $p(r)$ -Funktionen hat bei den beiden Co-Chaperonine eine unterschiedliche Form. Da bei einer Fouriertransformation des Football-Komplexes nur wenige Splines auf den ersten peak entfallen, wird aber seine Form nicht so genau beschrieben, wie beim Apo-Co-Chaperonin. Eine andere Ursache könnte die fehlende Korrektur des Transmissionseffekts bei den größeren  $q$ -Werten sein. Auf die kleinen  $q$ -Werte und damit die großen Abstände innerhalb der  $p(r)$ -Funktion hätte dieser Effekt keine Auswirkungen.

### **2.1.5. Substratbindung von GroEL**

Die Funktion von Chaperoninen ist die Bindung und Faltung von Substratprotein. Für ein wirkliches Verständnis des GroE-Reaktionszyklus müssen also Versuche mit GroEL und Substratprotein, nach Möglichkeit unter Beteiligung von GroES durchgeführt werden. Insbesondere nach der Reinigung des teildeutierten GroEL war eine Reihe vielversprechender Experimenten möglich:

- die Untersuchung der Struktur von GroEL und Substratprotein im Komplex, zunächst speziell an den bereits gut beschriebenen Substratproteinen MBP-Y283D (Sparrer et al., 1996) und Citrat-Synthase G276A (Zahn et al.).
- Tests der Bindung von protonierten, kommerziell erhältlichen Proteinen an GroEL und der Eignung als Substratprotein mit Hilfe der bei einer Komplexbildung auftreten negativen Interferenzen
- Untersuchungen von Komplexen aus den drei Komponenten GroEL, GroES und Substrat unter besonderer Berücksichtigung der Doppelbindung von GroES und Substrat
- zeitaufgelöste SANS-Messungen als vielleicht interessanteste Versuchsreihe

Zu Beginn der Arbeit wurden Komplexe aus protoniertem, unsichtbarem GroEL und volldeutiertem MBP (Mutante Y283D), sowie volldeutiertem GroES gemessen.

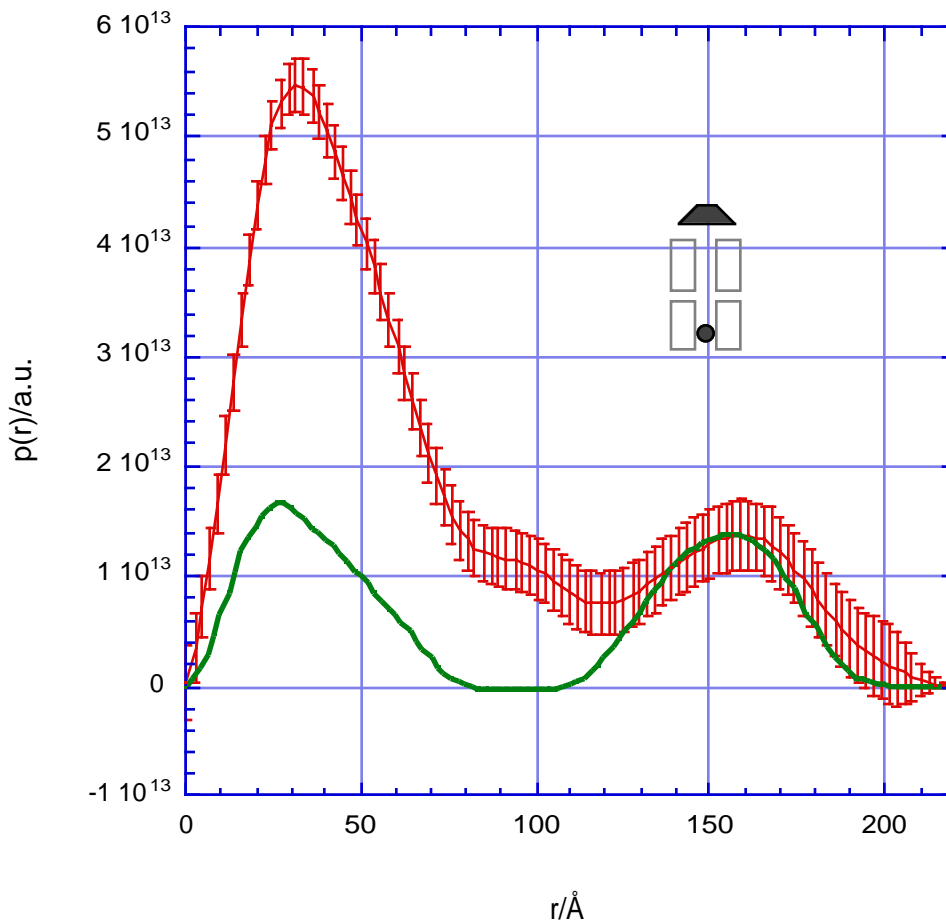


Abb. 2.17: protoniertes GroEL mit deuteriertem GroES und deuteriertem MBP-Y283D mit ADP in 40% D<sub>2</sub>O

rot: experimentelle Daten, grün: Modellkurve eines trans-Komplex

Der Peak auf der linken Seite der Abstandsverteilungsfunktion entspricht den Eigentermen von GroES und MBP; auf der rechten Seite sieht man den Interferenzterm zwischen GroES und MBP (Abb. 2.17). Die Zentren von GroEL und MBP sind 160 Å voneinander entfernt. Es ist aus der Kristallstruktur bekannt, daß der Abstand zwischen GroES und dem Zentrum von GroEL 100 Å beträgt. MBP und das Zentrum von GroEL haben demzufolge einen Abstand von 60 Å.

Wie man sieht ist der erste Peak im Experiment wesentlich höher, als im Modell, es liegt also nur eine Teilpopulation von trans-Komplexen vor. Ob sich in der Probe auch cis-Komplexe gebildet haben, kann anhand der Daten nicht beantwortet werden. Modellrechnungen zeigten, daß bei einem Abstand von 60 Å zwischen cis-MBP und dem Zentrum von GroEL die Peaks der Eigenterme und der Interferenzterme so stark

überlappen, das sie nicht mehr zu unterscheiden sind. Die Schulter in der experimentellen  $p(r)$ -Funktion könnte einerseits durch Cis-Komplexe mit einem anderen Abstand andererseits auch durch nicht vollständig gematchtes MBP erklärt werden.

In einem ähnlichen Experiment ohne GroES konnte die Existenz von GroEL-MPB 1:2-Komplexen, also die Bindung von MBP an beide Seiten des GroEL-Oligomers nachgewiesen werden (Abb. 2.18). Wegen der Symmetrie dieser Struktur kann den Daten der Abstand von  $60\text{\AA}$  zwischen den Zentren des Substratprotein und des GroEL-Oligomers entnommen werden.

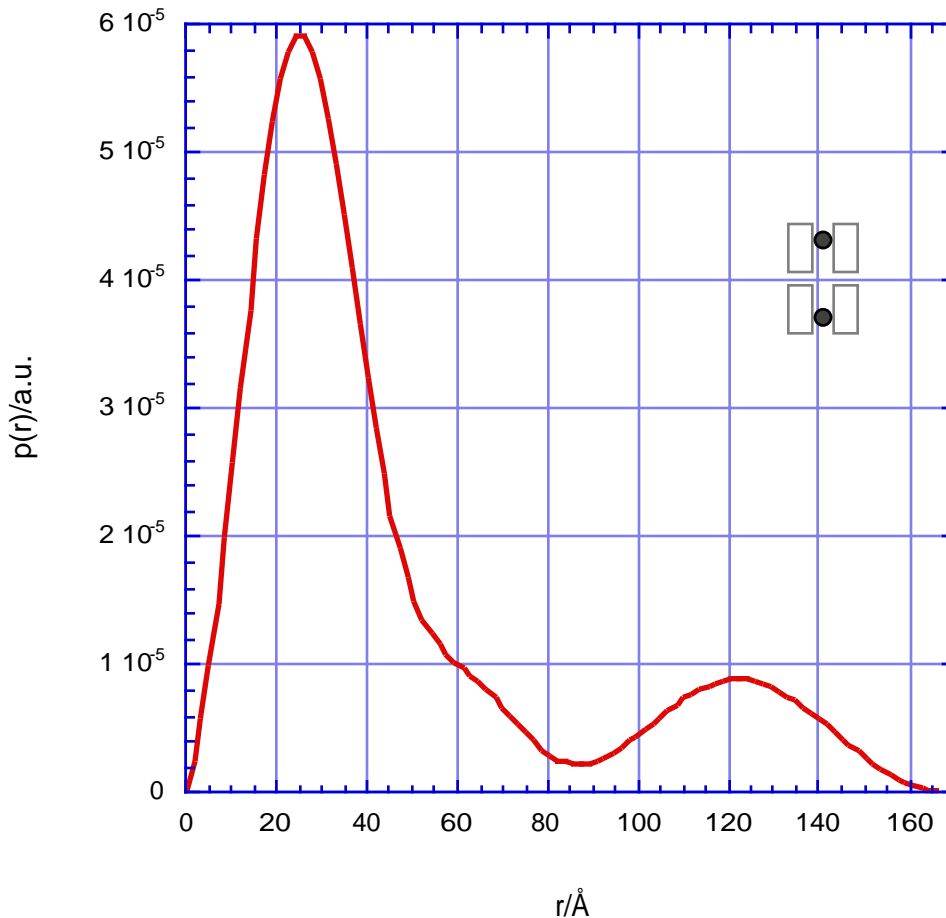


Abb. 2.18: protoniertes GroEL mit deuteriertem MBP-Y283D in 40% D<sub>2</sub>O

Um die GroEL-MBP-Komplexe mit einer ausreichenden Datenqualität (geringe Menge von Aggregaten) beobachten zu können, war es nötig, sie vorher über eine Säule laufen zu lassen oder einen frisch geformten Komplex etwa 20 Minuten bei 14000 rpm zu zentrifugieren. GroEL-MPB 1:2-Komplexe konnten nur nach Zentrifugation beobachtet

werden. Dies weist darauf hin, daß offensichtlich das zweite MPB-Molekül eine niedrigere Bindungskonstante hat als das erste.

#### Test von Substratprotein

Die Bindung einer Reihe von kommerziell erhältlichen Proteinen (wt-LDH (Laktat-Dehydrogenase), wt-MDH (Malat-Dehydrogenase) und wt-MBP) an GroEL wurde geprüft. In einigen Fällen konnte eine Bindung von chemisch denaturiertem Substrat durch einen negativen Interferenzeffekt nachgewiesen werden. Dieser zeigt sich in Abb. 2.19 in niedrigeren Werten der  $p(r)$ -Funktion zwischen 20 und 120 Å. Allerdings treten bei höheren Abständen starke Aggregationseffekte auf. Diese sind prinzipiell auch bei noch größeren Abständen zu sehen, für die Durchführung der indirekten Fouriertransformation ist allerdings die Definition einer Maximaldimension der untersuchten Struktur notwendig.

Nach thermischer Denaturierung wurden keine Komplexe beobachtet.

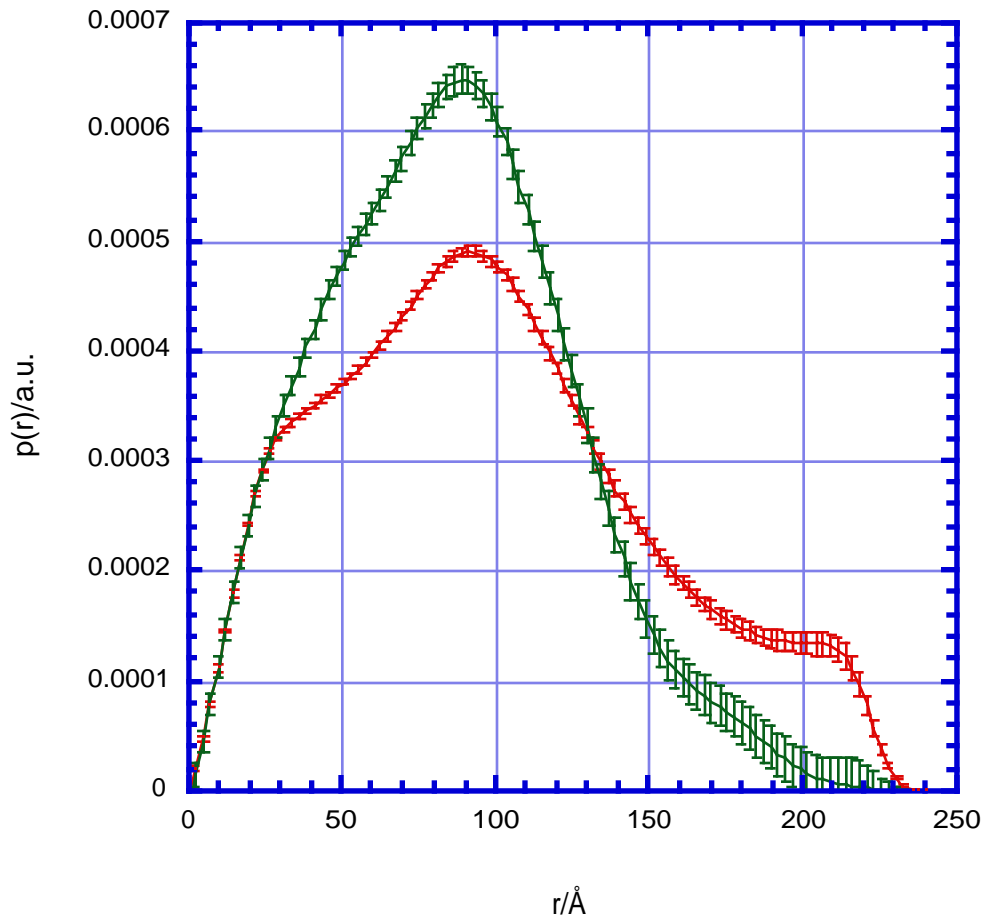


Abb. 2.19: teildeutiertes GroEL mit protoniertem wt-MBP in 92% D<sub>2</sub>O

grün: natives MBP, rot: mit Harnstoff denaturiertes MBP

Die relativen Flächenverhältnisse der beiden Kurven sind richtig, da die Proben aus den selben Stammlösungen hergestellt wurden.

Auf Grund der großen Probleme mit Aggregaten erschien eine zeitaufgelöste Beobachtung der Komplexbildung nicht sinnvoll – bei einer zeitaufgelösten Messung zur Komplexbildung ist es naturgemäß nicht möglich, die Probe abzuzentrifugieren oder über eine Säule laufen zu lassen.

### *Diskussion:*

In mehreren Versuchen konnten Komplexe zwischen GroEL und Substrat, teilweise auch mit Substrat und gleichzeitig GroES beobachtet werden. Saubere Daten wurden nur mit Faltungsmutanten (MBP, Y283D; Citrat-Synthase, G276A) die besonders stabil an GroEL binden, erreicht. Den  $p(r)$ -Funktionen kann man den Abstand zwischen zwei Substratproteinen (MBP) und zwischen Substratprotein und GroES in einem mit ADP gebildeten trans-Komplex entnehmen. Damit konnten im Resultate der Elektronenmikroskopie durch Lösungsstreuung bestätigt werden, nach denen dieser Komplex ein wesentlicher Bestandteil des Reaktionszyklus von GroEL ist. Die SANS-Daten erlaubten keine Aussage darüber, ob sich auch cis-Komplexe gebildet hatten.

Es erwies sich generell als sehr schwierig, interpretierbare Daten zu erhalten: zur Bindung an GroEL muß das Substratprotein denaturiert werden. In diesem Zustand neigt es aber naturgemäß zu Aggregationen, die das eigentliche Signal überdecken. Da in der Kleinwinkelstreuung das Signal bei gleicher Anzahl der Partikel proportional zum Quadrat der Masse (genauer der Streulänge) der Probenmoleküle ist, wirkt sich dieser Effekt stärker aus als bei anderen Methoden. Teilweise konnten die Aggregate durch eine Reinigung mit einem Molekularsieb entfernt werden. Ein solcher Zwischenschritt macht allerdings kinetische Experimente zur Bildung von GroEL-Substrat Komplexen unmöglich. Bei Dissoziationsexperimenten würde sich dieses Problem nicht stellen:

Durch Zugabe von ATP auf gereinigte GroEL-Substrat-Komplexe könnte etwa analog zu ähnlichen Fluoreszenzexperimenten die Auflösung dieser Komplexe analysiert werden.

Mit Citrat-Synthase G276A gab es weniger solcher Probleme, leider hat dieses Protein jedoch eine beschränkte Lebensdauer und kann nicht eingefroren werden. Wegen der zeitlichen Beschränkungen bei der Nutzung einer Neutronenquelle erscheint die Nutzung für dieses Proteins für SANS-Experimente nicht sinnvoll.

Die Versuche mit Substratprotein können somit insgesamt nicht als Erfolg betrachtet werden, die Probleme dabei liegen allerdings in einer Kombination von Eigenschaften des Systems (Verhalten von denaturierten Proteinen) und der Methode (Empfindlichkeit auf Aggregate) begründet. Bei der Vielzahl von Substratproteinen von GroEL ist nicht ausgeschlossen, daß bestimmte davon für SANS-Experimente geeignet sind. Sie zu finden wäre allerdings vom Zufall abhängig oder würde einen sehr hohen screening-Aufwand erfordern.



## 2.2. Kinetische Versuche

### 2.2.1. langsame Kinetiken: chasing-Versuche an den Co-Chaperoninen GroES und GP31

GP31 scheint stärker zur Bildung von Football-Komplexen mit GroEL zu neigen, als GroES (siehe Kapitel 2.1.4). Dies deutet auf Unterschiede im Bindungsverhalten von GP31 und GroES bezüglich GroEL hin. In statischen Experimenten mit AMP-PNP hatten wir die Bindung des zweiten Co-Chaperonin-Heptamers beobachtet, es erschien sinnvoll, auch die Bildung des asymmetrischen Komplexes zu charakterisieren. Messungen im Gleichgewicht führen in diesem Fall nicht zum Ziel: eine Acrylamid-Gelelektrophorese zeigte, daß bei einem GroEL-Co-Chaperonin-Verhältnis von 1:1 in Anwesenheit von Nukleotiden sowohl GroES als auch GP31 praktisch vollständig an GroEL binden (Elena Manakova, persönliche Kommunikation). Eine direkte Beobachtung der Bildung des Komplexes ist ebenfalls schwierig, da sie sich innerhalb von wenigen Sekunden vollzieht (Röbke, 2000, J. Appl. Crys.). Die Neutronenstreuung ermöglicht jedoch, mit sogenannten Chasing-Experimenten (Verdrängungsexperimenten) den Zerfall der Komplexe in Lösung zu beobachten (Abb. 2.20).

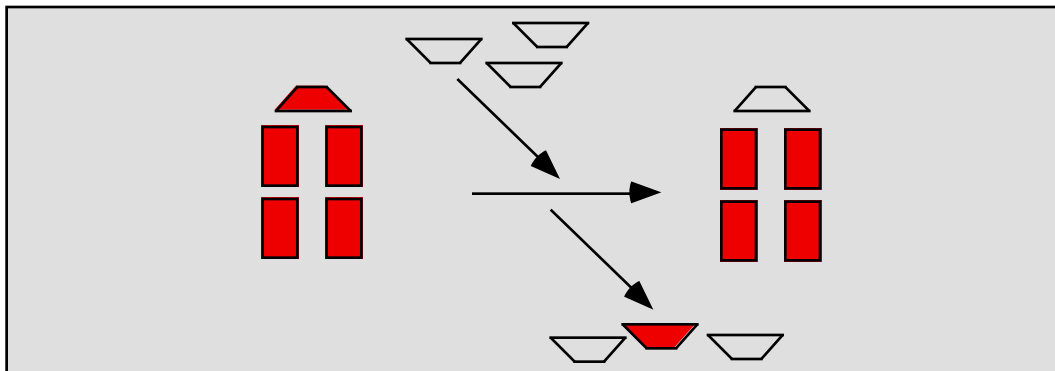


Abb. 2.20: Schema der Verdrängung von sichtbarem Co-Chaperonin im asymmetrischen GroEL-Co-Chaperonin Komplex durch einen Überschuß von unsichtbarem Co-Chaperonin

Hierbei wird zunächst ein Komplex aus protoniertem GroEL und einer äquimolaren Menge an protoniertem Co-Chaperonin gebildet (in unserem Fall einem Überschuß an ADP). Gibt man zu diesen Komplexen teildeutiertes GroES im Überschuß, verdrängt dieses das protonierte Co-Chaperonin. Die Komplexe aus sichtbarem GroEL und sichtbarem Co-Chaperonin haben andere Streukurven als ihre Analoge mit unsichtbarem Co-Chaperonin.

Wegen des starken Überschusses an teildeutiertem GroES wird nun in erster Linie die Zerfallsrate des Ursprungskomplexes gemessen. Im neuen Gleichgewicht wird in der Mehrheit der Komplexe das teildeutiertere GroES zu finden sein. Außerdem trägt gemäß dem Verhältnis an protoniertem und teildeutiertem GroES ein Restanteil an Komplexen von GroEL mit protoniertem Co-Chaperonin zum Signal bei. Das Signal des nicht gebundenen Co-Chaperonins ist wegen seiner geringen Masse sehr schwach.

Insgesamt wurden die Kinetiken von vier Reaktionen gemessen:

- Mischung von Komplexen aus protoniertem GroEL und protoniertem GroES mit einem Überschuß an teildeutertem GroES in 99% D<sub>2</sub>O
- Mischung von Komplexen aus protoniertem GroEL und protoniertem GP31 mit einem Überschuß an teildeutertem GroES in 99% D<sub>2</sub>O
- Mischung von Komplexen aus protoniertem GroEL und protoniertem GroES mit einem Überschuß an teildeutertem GroES in 80% D<sub>2</sub>O
- Mischung von Komplexen aus protoniertem GroEL und protoniertem GP31 mit einem Überschuß an teildeutertem GroES in 80% D<sub>2</sub>O

Die verwendeten Konzentrationen können Tabelle 2.2 entnommen werden.

Wird das Experiment in einem Puffer mit 99% D<sub>2</sub>O, dem Matchpunkt des teildeuterten GroES, durchgeführt, so kann man durch eine Beobachtung der Nullwinkelstreuung oder des Gyrationsradius direkt das Verhältnis von Komplexen mit sichtbarem und unsichtbarem Co-Chaperonin verfolgen. In einem Puffer mit niedrigerem D<sub>2</sub>O-Gehalt, in unserem Fall 80% D<sub>2</sub>O, haben die Streudichten des protonierten und des teildeuterten Proteins unterschiedliche Vorzeichen. Dies resultiert in einem charakteristischen negativen Interferenzpeak in der p(r)-Funktion (Abb. 2.21). Damit kann die Neubildung des Komplexes nachgewiesen werden und es wird ausgeschlossen, daß man nur eine Zerfallsreaktion und keine Verdrängung beobachtet.

Zur Signifikanz der Daten ist anzumerken, daß sich die Fehlerbereiche der beiden p(r)-Funktionen zwar sehr nahe kommen, die Ergebnisse bei den großen Abständen und die Flächen der beiden Kurven unterscheiden sich jedoch deutlich. Bei einem Vergleich der Flächen der beiden p(r)-Funktionen muß vor allem beachtet werden, daß die Fehlerbalken jeweils für einen Meßpunkt gelten, auf Grund der hohen Zahl an Punkten steht die Signifikanz der Flächenunterschiede außer Frage.

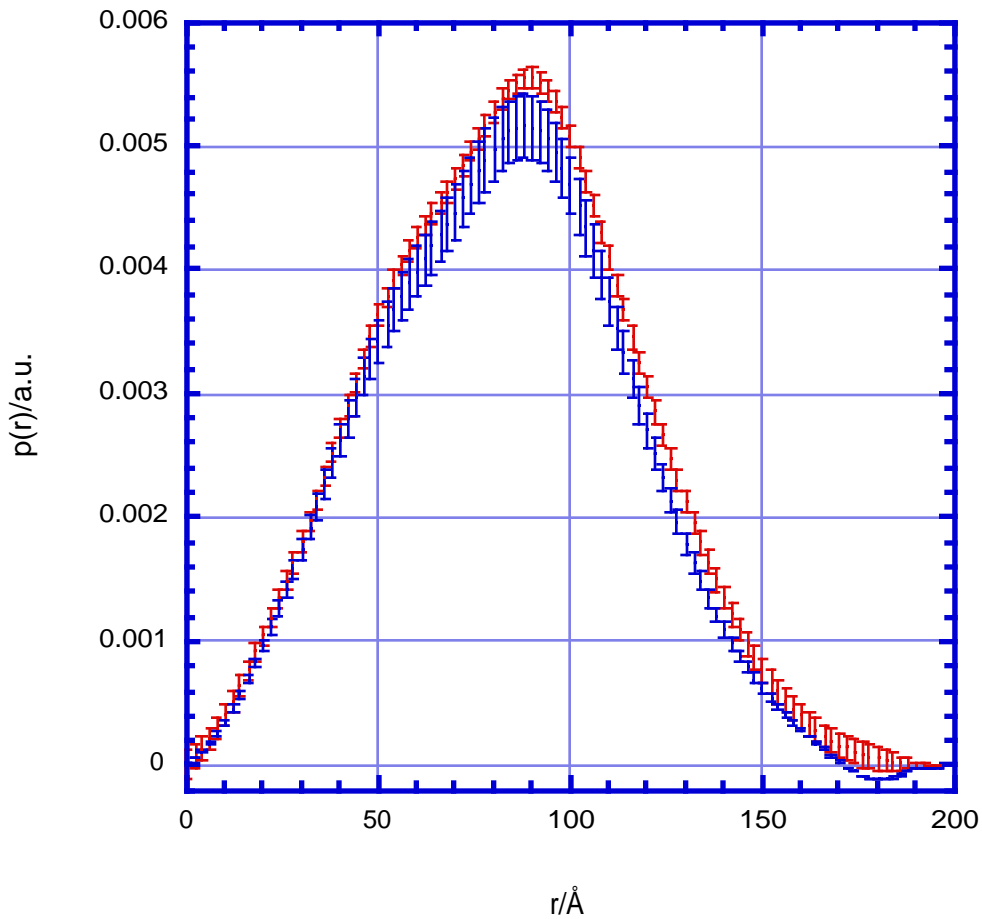


Abb. 2.21: protoniertes GroEL mit protoniertem GP31 und ADP nach Zugabe von 80% D<sub>2</sub>O-Puffer nach Zugabe von teildeutertem GroES

rot: nach einer Minute, blau: nach 15 Stunden

Die Streukurven wurden unterschiedlich lang gemessen. Aus diesem Grund wurden für die Fouriertransformationen unterschiedliche Lambda-Parameter verwendet. Dies führt wiederum zu unterschiedlichen großen Fehlerbalken.

Auf der Ebene der Streukurve ist in erster Linie ein Unterschied bei sehr kleinen q-Werten zu bemerken.

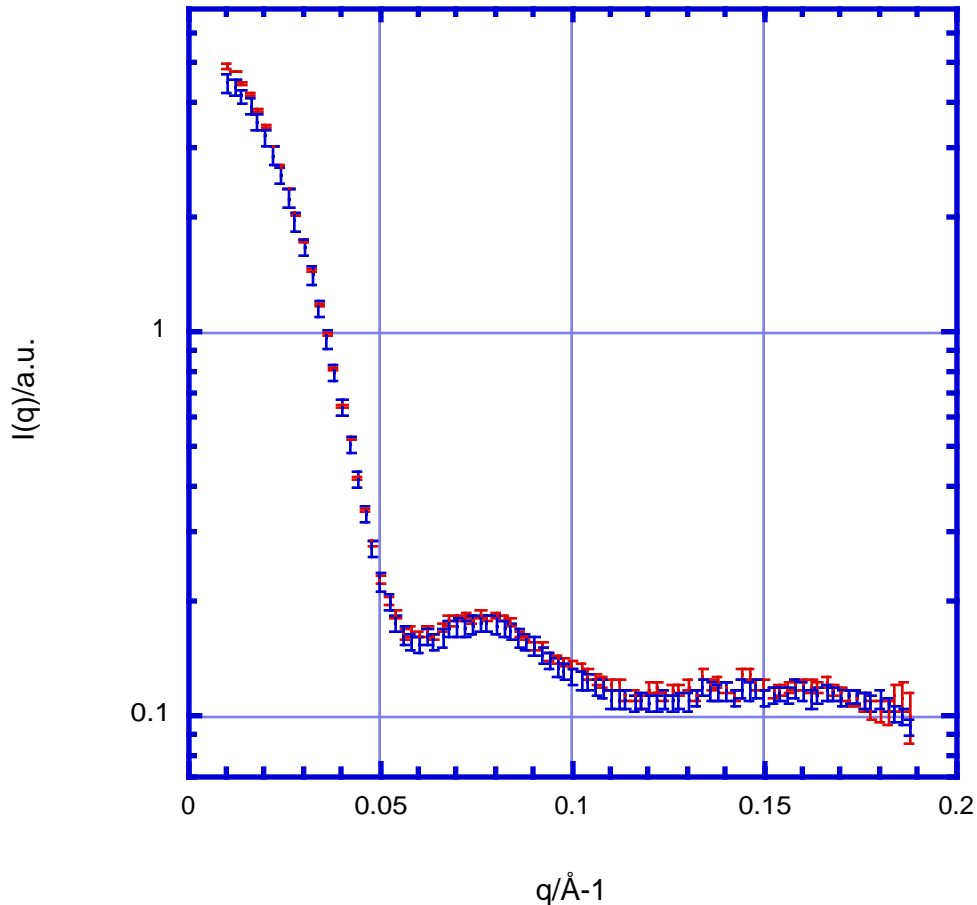


Abb. 2.22: protoniertes GroEL mit protoniertem GP31 und ADP in 80% $D_2O$ -Puffer nach Zugabe von teildeutertem GroES  
rot: nach einer Minute, blau: nach 15 Stunden

Wie man den Darstellungen entnehmen kann, ist die zeitliche Änderung der Kurven nur sehr gering, für die kleinen  $q$ -Werte beträgt sie etwa 10 Prozent, bei großen  $q$ -Werten geht sie sogar in der Statistik unter (Abb. 2.22). Aufgrund der logarithmischen Abbildung ist selbst der bestehende Unterschied kaum bemerkbar.

Es ist daher angebracht, leichter interpretierbare eindimensionale Parameter zur Darstellung der Daten zu verwenden. Solche Größen sind der Streumassenradius ( $R_G$ ) und die Nullwinkelstreuung ( $I(0)$ ).  $I(0)$  hat dabei den Vorteil eines geringeren Fehlers und seine Quadratwurzel ( $\sqrt{I(0)}$ ) ist in einen direkten Zusammenhang mit der Masse der Proteinkomplexe.

Stellt man  $\sqrt{I(0)}$  in Abhängigkeit von der Zeit dar, erkennt man, daß diese Größe in einem Zeitraum von mehreren Stunden nach dem Mischen beständig abnimmt. (Abb. 2.23 und 2.24).

Die Daten lassen sich mit zwei Exponentialfunktionen fitten.

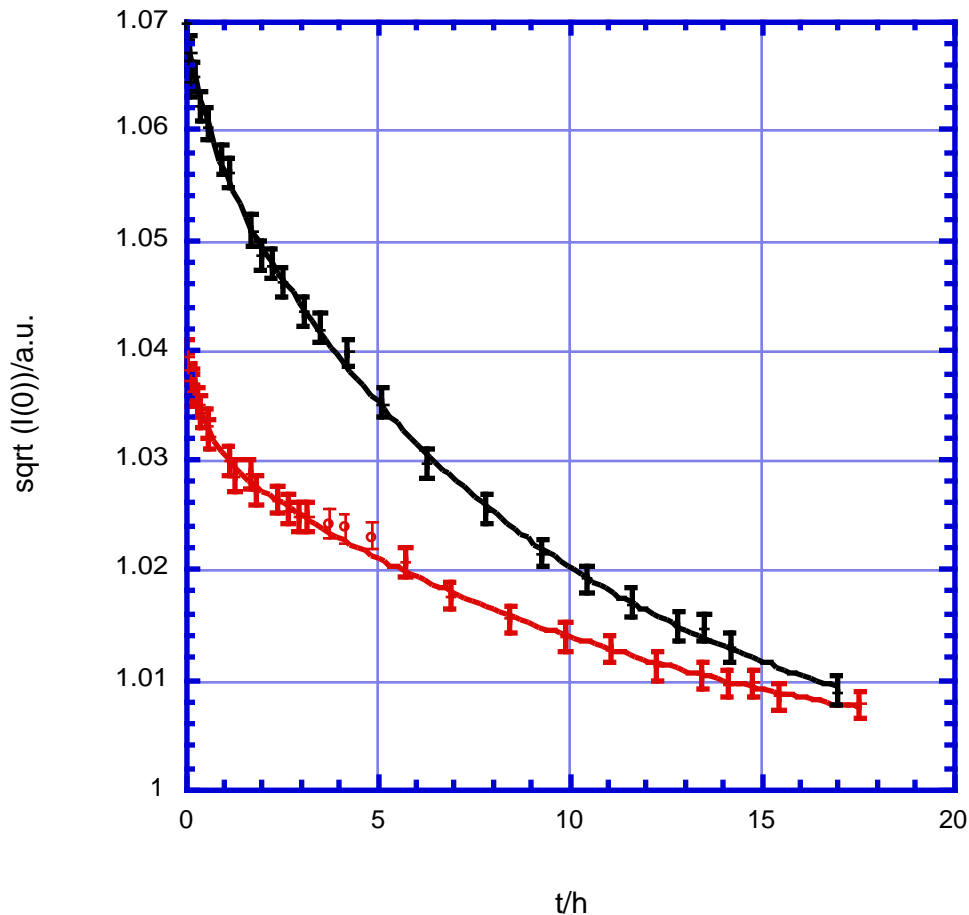


Abb. 2.23: chasing von protoniertem Co-Chaperonin im Komplex mit protoniertem GroEL und ADP durch teildeutertes GroES (6-facher Überschuß) in 99% D<sub>2</sub>O-Puffer

doppelt exponentieller fit:  $y = m1 + m2 \cdot \exp(-m3 \cdot t) + m4 \cdot \exp(-m5 \cdot t)$

schwarz: chasing von protoniertem GP31 Korrelationskoeffizient  $r=0.99933$

rot: chasing von protoniertem GroES Korrelationskoeffizient  $r=0.99913$

Die mit offenen Kreisen dargestellten Meßpunkte wurden nicht für den Fit herangezogen, da hier offensichtlich das Signal gestört ist.

Auf der Ordinate wird das normierte sichtbare Streusignal gezeigt. Im Fall eines hinreichend großen Überschusses an teildeutertem GroES gehen die Werte im Gleichgewicht also gegen Eins.

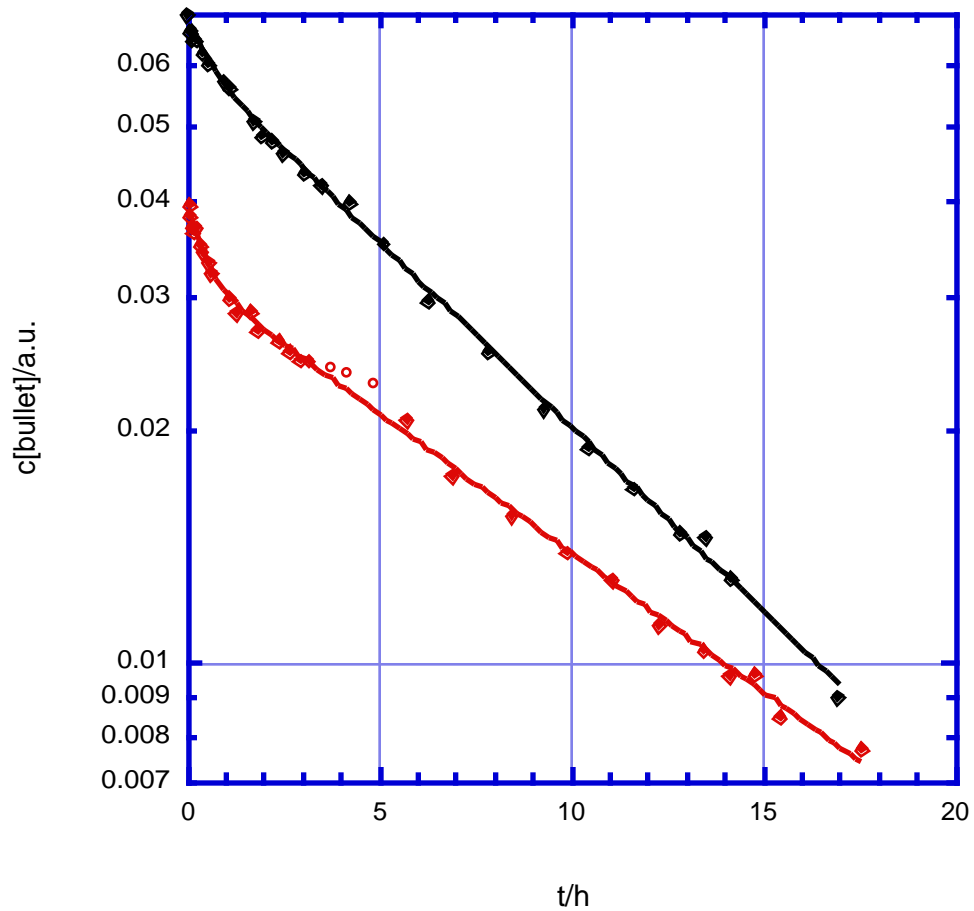


Abb. 2 24: chasing von protoniertem Co-Chaperonin im Komplex mit protoniertem GroEL und ADP durch teildeutertes GroES (6-facher Überschuß) in 99% D<sub>2</sub>O-Puffer

Auf der Ordinate wird die Konzentration der sichtbaren Bullet-Komplexe, also der Komplexe aus protoniertem GroEL mit protoniertem Co-Chaperonin gezeigt. Im Fall eines hinreichend großen Überschusses an teildeutertem GroES gehen die Werte im Gleichgewicht also gegen Null.

Aus diesen Daten lassen sich die Dissoziationsraten  $k_{-1}$  der Reaktion  
 $\text{GroEL} + \text{Co-Chaperonin} \rightleftharpoons \text{GroEL} \cdot \text{Co-Chaperonin}$   
 errechnen. Nachdem für den Fit zwei Exponentialfunktionen nötig waren, finden sich  
 auch jeweils zwei Dissoziationsraten mit den folgenden Werten (Tabelle 2.1):

	GroEL-GroES:	GroEL-GP31:
	„schnelle“ Reaktion	
80% D <sub>2</sub> O	$1.30 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1} \pm 4.17 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$4.87 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1} \pm 3.41 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
99% D <sub>2</sub> O	$5.65 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1} \pm 9.35 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	$4.43 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1} \pm 1.54 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
	„langsame“ Reaktion	
80% D <sub>2</sub> O	$3.86 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1} \pm 6.11 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	$5.42 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1} \pm 9.00 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$
99% D <sub>2</sub> O	$2.32 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1} \pm 2.83 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	$3.06 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1} \pm 2.78 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$

Tabelle 2.1: Dissoziationsraten von GroEL und GP31

Protein- und Nukleotidkonzentrationen:

protoniertes GroEL:	6,5μM
protoniertes GroES:	5.2μM
protoniertes GP31:	4.45μM
teildeuteriertes GroES:	40μM
ADP:	3mM

Tabelle 2.2: Protein- und Nukleotidkonzentrationen in den Verdrängungsexperimenten

*Diskussion:*

*Allgemeine Betrachtung:*

Durch Verdrängungskinetiken wurde das Bindungsverhalten der Co-Chaperonine GroES und GP31 im asymmetrischen Komplex charakterisiert und verglichen. Hierzu wurden zunächst Komplexe aus protoniertem Co-Chaperonin und protoniertem GroEL mit ADP im Verhältnis von etwa 1:1 vorgeformt. Nach einhelliger Meinung in der Literatur bilden sich unter diesen Umständen ausschließlich Bullet-Komplexe. Zu dieser Lösung wurde dann unter Kontrastausgleichsbedingungen ein etwa neunfacher Überschuß an teildeutertem, unsichtbarem GroES gegeben. Beim Zerfall des ursprünglichen Komplexes ist die Neubildung von Komplexen aus protoniertem GroEL und teildeutertem GroES zu erwarten. Eine zeitaufgelöste Beobachtung des Zerfalls liefert dann Informationen über die off-rate der Komplexe.

Der Austausch der Co-Chaperonine gelang: sowohl die Nullwinkelstreuung als auch die Streumassenradien gehen nach Zugabe des teildeuterten GroES zurück. In einem Kontrollexperiment wurde gezeigt, daß sich tatsächlich nach dem Zerfall neue Komplexe bilden: bei einer Messung der Proben in 80% D<sub>2</sub>O haben die Streulängen von protoniertem GroEL und – jetzt sichtbarem - teildeuterten GroES unterschiedliche Vorzeichen. Nachdem die beiden Proteine Komplexe formen, ergeben sich für die großen Abstände in der p(r)-Funktion negative Werte. Die Daten zeigen also, daß das protonierte Co-Chaperonin vom teildeuterten GroES verdrängt wurde.

Für die Interpretation der zeitaufgelösten Daten erscheint die Quadratwurzel der Nullwinkelstreuung als geeignetster Parameter, weil sie direkt mit der Streulänge und somit der „sichtbaren“ Masse der Komplexe gekoppelt ist.

Strenggenommen trägt auch das vom Komplex abgefallene Co-Chaperonin zu den Streukurven bei, in der Praxis kann sein Signal aber vernachlässigt werden, wie folgende Rechnung zeigt:

Bullet-Komplexen aus GroEL (MW=800kDa) und GroES (MW=70kDa) haben ein Molekulargewicht von 870kDa. Vernachlässigt man GroES, haben also Nullwinkelstreuung zu Beginn des Versuches und im Gleichgewicht ein Verhältnis von 870/800, die Differenz beträgt 8.75%.

Berücksichtigt man GroES, ergibt sich ein Verhältnis von

$\sqrt{870^2} / \sqrt{800^2 + 70^2}$ , dies entspricht etwa 870/803, die Differenz beträgt also 8.34%.

#### *Bedeutung der gemessenen Dissoziationsraten:*

Der zeitabhängige Rückgang von  $\sqrt{I(0)}$  läßt sich für die Daten aller vier Versuche mit zwei Exponentialfunktionen fitten. Die Komplexe haben Halbwertszeiten in der Größenordnung von Stunden, was mit den Ergebnissen von Oberflächenplasmonenresonanz-Experimenten übereinstimmt (Hayer-Hartl, 1995).

Bei den mit verschiedenen Kontrasten gemessenen Daten fällt zunächst auf, daß sowohl GroEL-GroES-Komplexe als auch GroEL-GP31-Komplexe in 99% D<sub>2</sub>O etwas langsamer zerfallen als in 80% D<sub>2</sub>O. Hier muß es sich um einen Isotopeneffekt des Puffers handeln: es ist u.a. vorgeschlagen worden, daß D<sub>2</sub>O hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert (Kushner); damit könnte der Zerfall der Komplexe abgebremst werden.

Vergleicht man die jeweils analogen Daten der Komplexe von GroEL mit GroES und mit GP31, erkennt man, daß in allen Fällen die Dissoziationsraten der GroEL-GP31-Komplexe niedriger sind, als die von GroEL-GroES-Komplexen. Der GroEL-GP31-Komplex zerfällt also langsamer als sein Analogon mit GroES. Für Daten der „langsamen“ Reaktion – bei der mehr Punkte mit längeren Meßzeiten vorliegen – ist dieser Unterschied deutlich außerhalb der Fehlergrenzen. Der Unterschied der Dissoziationsraten der „schnellen“ Reaktion ist am Rand der statistischen Relevanz. Da die Messungen in beiden Kontrasten dieselbe Tendenz zeigen, kann jedoch mit beachtlicher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, daß auch hier eine höhere Stabilität der Komplexe mit GP31 vorliegt.

Es stellt sich die Frage, warum der Zerfall nicht monoexponentiell ist. Zwei Gründe dafür sind denkbar:



Die naheliegendste Erklärung wäre das Auftreten von zwei verschiedenen Komplexpopulationen in der Probe. Man könnte sich beispielsweise vorstellen, daß ein Teil der Komplexe nur den cis-Ring von GroEL mit ADP besetzt hat, eine anderer Teil aber beide Ringe. Jede der beiden Populationen wäre dann für jeweils eine der Exponentialfunktionen verantwortlich.

Nach einem zweiten Erklärungsmodell ist der beobachtete Effekt durch den mit dem Faktor sechs relativ kleinen Überschuß des teildeutierten GroES verursacht. Zu Beginn der Reaktion ist das gesamte protonierte Co-Chaperonin an GroEL gebunden, es wird ausschließlich durch teildeutiertes GroES verdrängt. Zu diesem Zeitpunkt kann die wirkliche Dissoziationsrate des Komplexes beobachtet werden. Später ist in der Lösung auch freies, bereits von GroEL abgefallenes protoniertes Co-Chaperonin. Dieses konkurriert jetzt mit dem teildeutiertem GroES um die Wiederbesetzung freier GroES-Bindungsplätze. Diese Rückreaktion wird damit scheinbar verlangsamt. Eine mathematische Überprüfung dieser Hypothese erwies sich jedoch als sehr schwierig.

#### *Bedeutung der unterschiedlichen Dissoziationsraten von GroES und GP31*

Biologisch interessanter wäre natürlich eine Untersuchung von ATP-Bullet-Komplexen, bei denen eine wesentlich höhere Dissoziationsrate zu erwarten ist (Hayer-Hartl et al., 1995). Wegen der schnellen Hydrolyse von ATP ist eine solche Versuchsreihe jedoch nicht möglich.

Wir gehen jedoch davon aus, daß wenn GroEL-GP31-ADP-Komplexe eine niedrigere Dissoziationsrate haben als ihre Analoge mit GroES, diese Tendenz auch für Komplexe mit anderen Nukleotiden gilt; Grundlage der Bindung sind schließlich in jedem Fall Wechselwirkungen zwischen denselben Regionen von GroEL und Co-Chaperonin.

Welche Bedeutung haben die unterschiedlichen Dissoziationsraten des *E. coli*-Co-Chaperonins GroES und seines Phagenanalogen GP31 für den Chaperonin-Reaktionszyklus? Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, hat ein GroEL-GP31-Komplex einen größeren Hohlraum (Anfinsen cage) zur Faltung von Substratprotein, als der „normale“ GroEL-GroES-Komplex (siehe Kapitel 2.1.4). Dies dürfte den notwendigen Platz für die Faltung des relativ großen Phagenproteins Gp23 schaffen. GP31 hat deswegen eine unterschiedlich Struktur der „mobile loops“, was die Änderung des Bindungsverhaltens bedingen könnte. Es ist nicht auszuschließen, daß die unterschiedlichen Dissoziationsraten ein funktionsloser Nebeneffekt der Strukturunterschiede zwischen den „mobile loops“ sind.

Mit derselben Legitimation kann man sich aber auch eine biologische Bedeutung der unterschiedlichen Dissoziationsraten vorstellen. Bei einer stabileren Bindung des Co-Chaperonins erhöht sich die Verweildauer von Gp23 im Anfinsen cage. Da dieses Substratprotein relativ groß ist, dürfte es eher komplizierte Faltungswege besitzen. Die Zeit zum Erreichen des nativen Zustands dürfte deshalb länger dauern. Ist GP23 länger im Chaperonin-Komplex eingeschlossen, verringert sich die Wahrscheinlichkeit, daß ein noch nicht vollständig gefaltetes Protein mit anderen ungefalteten Proteinen in der Zelle Aggregate bildet.

### 2.2.2. schnelle Kinetiken mit Hilfe der stopped-flow-Technik

Der GroE Reaktionszyklus hat nach heutigem Kenntnisstand eine Dauer von der Größenordnung 20s. Zur direkten Beobachtung der Einzelschritte werden also Methoden mit einer Auflösung mindestens im Sekundenbereich benötigt.

Mit der Röntgenkleinwinkelstreuung können Daten über die Lösungsstruktur von Proteinen mit einer Zeitauflösung von weniger als einer Sekunde gewonnen werden (an GroEL/GroES wurden solche Untersuchungen von Manfred Rößle durchgeführt: Rößle et al., 2000, J. Appl. Crys., Rößle, 2001). Wenn mehr als zwei Strukturen gleichzeitig auftreten, ist der Informationsgehalt der Daten allerdings beschränkt, da verschiedene Mischungen von Strukturen und Komplexen zu sehr ähnlichen Streukurven führen können.

Gerade bei kinetischen Messungen ist prinzipiell die Möglichkeit der Neutronenstreuung, bestimmte Teile von Komplexen hervorzuheben oder unsichtbar zu machen, von Vorteil. Ein Beispiel hierfür ist der GroEL-GroES-Football-Komplex, der nach bestimmten Modellen als transiente Struktur entstehen sollte: wenn ein solcher Komplex nur mit einer Teilpopulation von GroEL gebildet wird, würde er in Röntgendaten untergehen, mit Neutronen ist er nachweisbar.

Da sich in kinetischen Experimenten definitionsgemäß die Streukurve mit der Zeit ändert, wäre es nicht schwierig, ein Spektrum aus den Daten mehrerer Detektorabstände zusammenzusetzen. Das SANS-Diffraktometer D22 am ILL ermöglicht Messungen mit einem weiten q-Bereich und hat weltweit den höchsten Neutronenfluß. Daher war es das Instrument der Wahl für alle kinetischen Messungen.

In unseren Experimenten wurden die Reaktionen durch Mischung von zwei Lösungen in "stopped-flow"-Apparaturen gestartet (siehe Material und Methoden, Kapitel 4.3.). Diese Geräte erlauben es, definierte Volumina in einer definierten Zeit mit Hilfe von zwei oder mehreren Spritzen zu mischen. Von der Mischzelle aus wird die Probe in die Küvette gespritzt, in der sie bis zum Ende der jeweiligen Messung stehen bleibt. Um die Statistik zu verbessern, wurden alle Messungen jeweils zehn Mal wiederholt.

Zunächst wurden Versuche zur Mischung von protoniertem GroEL mit protoniertem GroES unternommen. Dies erlaubte die Apparaturen und das Zusammenspiel zwischen den Elektroniksystemen von D22 und der stopped-flow-Apparaturen zu testen. Die Darstellung von einzelnen und aufsummierten Streukurven zeigt zunächst, daß bereits Messungen im Sekundenbereich am System GroE deutliche Strukturinformationen enthalten (Abb. 2.25).

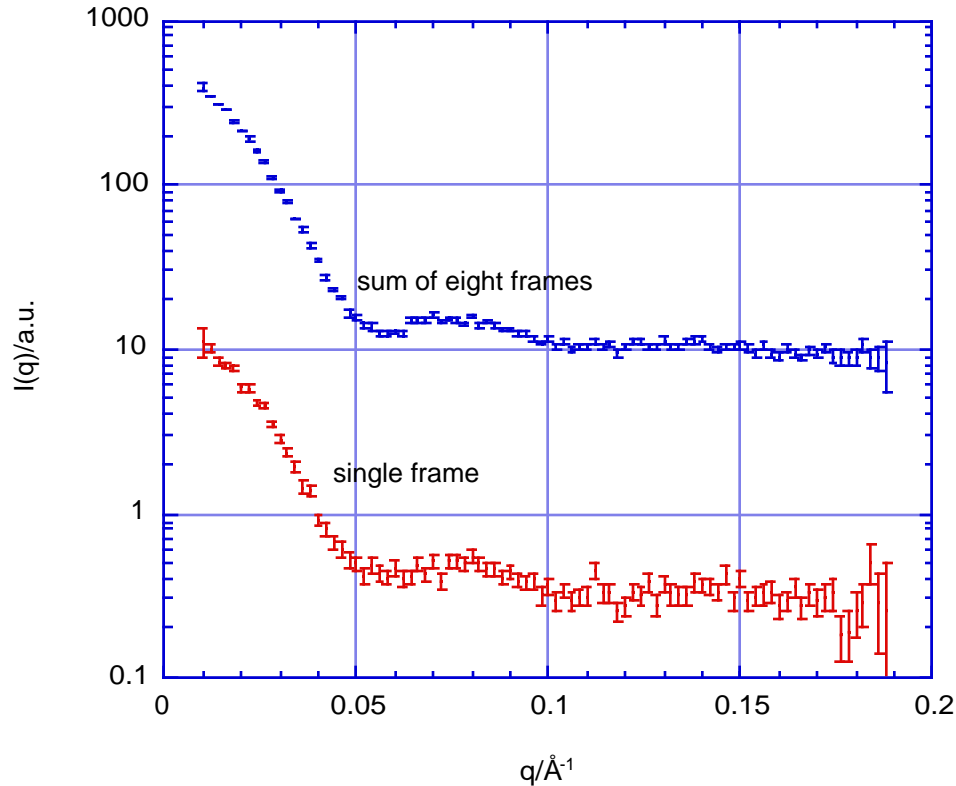


Abb. 2.25: Streukurven von protoniertem GroEL und protoniertem GroES mit ADP in D<sub>2</sub>O-Puffer, Daten vor Abzug des Untergrunds, zur Deutlichkeit um einen willkürlich gewählten Faktor verschoben  
rot: eine Messung von 1.1s, blau 8x1.1s

Leider gelang es nicht, reproduzierbare SANS-Kurven mit zeitabhängigen Änderungen im Sekundenbereich aufzunehmen. Dies lag zum einen daran, daß einige der untersuchten Reaktionen möglicherweise doch schneller sind als erhofft, und die Proben bereits in der experimentellen Totzeit ihr Gleichgewicht erreichten. Außerdem ergaben sich größere Schwierigkeiten mit den Mischapparaturen als erwartet. Vor allen der schnelle Übergang der Proteinlösung von einem Schlauch mit einem Querschnitt von 1mm in eine Küvette mit einem rechteckigen Querschnitt von 1mm x 9mm erwies sich als Quelle von Problemen.

Eine Betrachtung der Daten der langsamen Kinetiken erlaubt jedoch eine weitere Abschätzung des Potentials zeitaufgelöster SANS-Experimente.

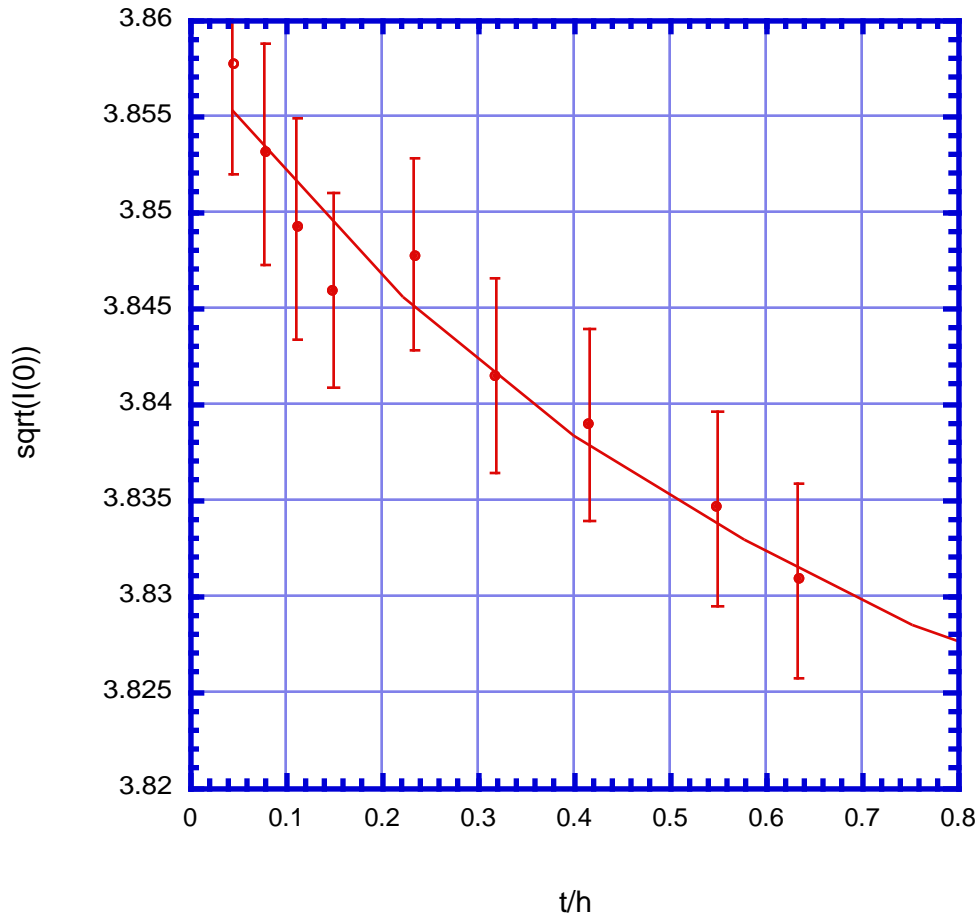


Abb. 2.26: protoniertes GroEL mit protoniertem GroES mit ADP in D<sub>2</sub>O-Puffer nach Zugabe von sechsfachen Überschuß von teildeutertem, unsichtbarem GroES, Konzentration 10mg/ml, Volumen im Strahl: 154 µl

Die in Abb. 2.26 gezeigten Daten resultieren aus der Beobachtung einer Probe aus GroEL und GroES in D<sub>2</sub>O-Puffer. Die ersten Meßpunkte wurden mit einem Abstand von 120 s aufgenommen. Wie man erkennt, kann dabei die Quadratwurzel von  $I(0)$ , also das Molekulargewicht des beobachteten Komplexes mit einer Genauigkeit von etwa 0.25% bestimmt werden. Die Differenz zwischen der Masse von GroEL und GroEL-GroES-Bullet-Komplex beträgt etwa 8%. Geht man davon aus, daß die Statistik durch eine 10-fache Wiederholung des Experiments und eine Aufsummierung dieser Daten verbessert werden kann, erscheint eine Beobachtung der Komplexbildung von GroEL und GroES im Sekundenbereich möglich.

### *Diskussion:*

Der im Vergleich zu Synchrotrons geringe Fluß von Neutronenquellen kann bei statischen Messungen durch eine längere Meßzeit ausgeglichen werden. Bei kinetischen Messungen ist dies naturgemäß nicht möglich, die Statistik der Ergebnisse wird also immer um mehrere Größenordnungen schlechter bleiben. Dennoch bietet die Neutronenstreuung Vorteile, die sie für bestimmte Versuche interessant erscheinen läßt, speziell die Möglichkeit der Kontrastvariation und das Fehlen eines Strahlenschadens. Im Gegensatz zu Röntgenmessungen kann auch die Nullwinkelstreuung sauber bestimmt werden, weil keine Detektorartefakte auftreten.

Auch wenn bei keiner der während dieser Arbeit durchgeführten SANS-Messungen im Sekundenbereich relevante Ergebnisse zum System GroE gewonnen wurden, konnte gezeigt werden, daß die Methode von ihrer Datenqualität her grundsätzlich für zeitaufgelöste Messungen an Proteinkomplexen einer mit GroE vergleichbaren Größe geeignet ist.

## 2.3. statische Versuche am Thermosom

### 2.3.1. Konformationsänderungen zwischen offener und geschlossener Struktur

#### Kristallstruktur versus EM-Struktur

(Gutsche et al., 2000, Current Biology)

In EM-Aufnahmen zeigt das Thermosom ähnlich wie GroEL eine zylinderartige Struktur aus zwei Ringen (siehe Kapitel 1.1.3). Es hat ebenfalls offene Hohlräume an beiden Enden, die vermutlich Substratprotein aufnehmen können. In der Röntgenkristallstruktur dagegen sind die Hohlräume durch eine andere Anordnung der apikalen Domänen geschlossen.

Als Erklärung für diese Diskrepanz wurde ein Nukleotideffekt vorgeschlagen: in den Thermosom-Kristallen bindet das Protein ADP-AlF<sub>3</sub>. Diese Verbindung wird als Analogon einer Übergangsstruktur von ATP während seiner Hydrolyse betrachtet. Möglicherweise träte also im Kristall die ATP-Konformation auf.

Ein anderes Erklärungsmodell für die beobachteten Strukturunterschiede erschien jedoch genauso plausibel: im Kristall ist das Protein Wechselwirkungen mit seinen Nachbarn ausgesetzt und befindet sich in einer nicht-physiologischen Pufferumgebung. Für die EM wiederum muß eine Proteinlösung eingefroren werden. Aus diesem Grund wurde die Kleinwinkelstreuung unter Lösungsbedingungen benutzt, um diese und andere offene Fragen zur Struktur des Thermosoms zu untersuchen.

Welchen Beitrag kann die Kleinwinkelstreuung zur Aufklärung der Lösungsstruktur des Thermosoms leisten? In der geschlossenen Konformation treten im Mittel kürzere Abstände auf als in der offenen. Dies muß sich auf der Ebene der Streukurve in einer Verschiebung charakteristischer Minima und Maxima zu höheren q-Werten hin auswirken. Um mehr als diese allgemeine Aussage machen zu können, wurden auf der Basis der Kristallstruktur und eines auf EM-Aufnahmen beruhenden Modells theoretische Streukurven und p(r)-Funktionen errechnet (Manfred Rößle mit Hilfe Lars-Oliver Essen, siehe Modellkurven in Abb. 2.27). Die Modellkurven zeigen in der Tat deutliche Unterschiede, außerhalb der üblichen Fehlergrenzen experimenteller Daten.

Zusätzlich zu vollständig offenen oder geschlossenen Strukturen existiert auch eine Konformation, bei der ein Ring offen und ein Ring geschlossen ist. EM-Bilder zeigen, daß sich die beiden Hälften der asymmetrischen Struktur stark von den entsprechenden Hälften der symmetrischen Strukturen unterscheiden (Schoen et al, JMB 296); zur korrekten Modellierung ist es also nicht ausreichend, jeweils einen Ring aus offener und geschlossener Konformation zu kombinieren. Da die Qualität der Elektronendichtekarten nicht ausreicht, um glaubwürdige Modellkurven für den Vergleich mit SANS-Daten aufzustellen, wird im folgenden auf die Darstellung der asymmetrischen Konformation verzichtet.

Zweidimensionale EM-Aufnahmen von Gutsche et al. (FEBS) im Anschluß an SANS-Arbeiten ergaben sogar vier Konformationen in Abhängigkeit von den Nukleotiden im Puffer. Da das Protein dabei nur in der Aufsicht erscheint, enthalten die entsprechenden EM-Bilder jedoch nicht genügend Strukturinformation für eine Modellierung von Streukurven.

Messungen von Apo- $\alpha\beta$ -Thermosom in einem physiologischen Puffer ergaben eine offene Struktur über einen Temperaturbereich von 10°C bis hin zur für *Thermoplasma acidophilum* physiologischen Temperatur von 55°C. In einem Puffer ohne Nukleotid, aber mit dem im Kristallisationspuffer verwendeten  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dagegen wurde eine im Vergleich zum physiologischen Puffer wesentlich geschlossenere Form beobachtet (man beachte in den Streukurven von Abb. 2.27 die Nebenmaxima bei  $0.07\text{\AA}^{-1}$ , und in den  $p(r)$ -Funktionen von Abb. 2.28 die Maxima). Hierbei musste im Gegensatz zu den vorherigen Messungen  $\text{H}_2\text{O}$  statt  $\text{D}_2\text{O}$  für den Puffer verwendet werden, da das Protein im  $\text{D}_2\text{O}$ -Puffer stark aggregierte. In Kontrollversuchen mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und  $\text{NH}_4\text{Cl}$  konnte gezeigt werden, daß das  $\text{SO}_4$ -Ion für die Schließung verantwortlich ist. Später durchgeführte Versuche mit  $\text{ADP-AlF}_x$  in einem Puffer ohne  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  zeigte, daß  $\text{ADP-AlF}$  alleine keine Schließung von Thermosom induziert. (Wie im Fall von  $\text{BeF}$  (Kapitel 2.1.4) entstehen bei der Mischung von Al- und F-Salzen verschiedene Formen von Verbindungen, die Komplexe mit ADP bilden. DA nicht nachgewiesen wurde, in welcher Verteilung diese Verbindungen auftreten, werden sie hier als  $\text{ADP-AlF}_x$  bezeichnet.)

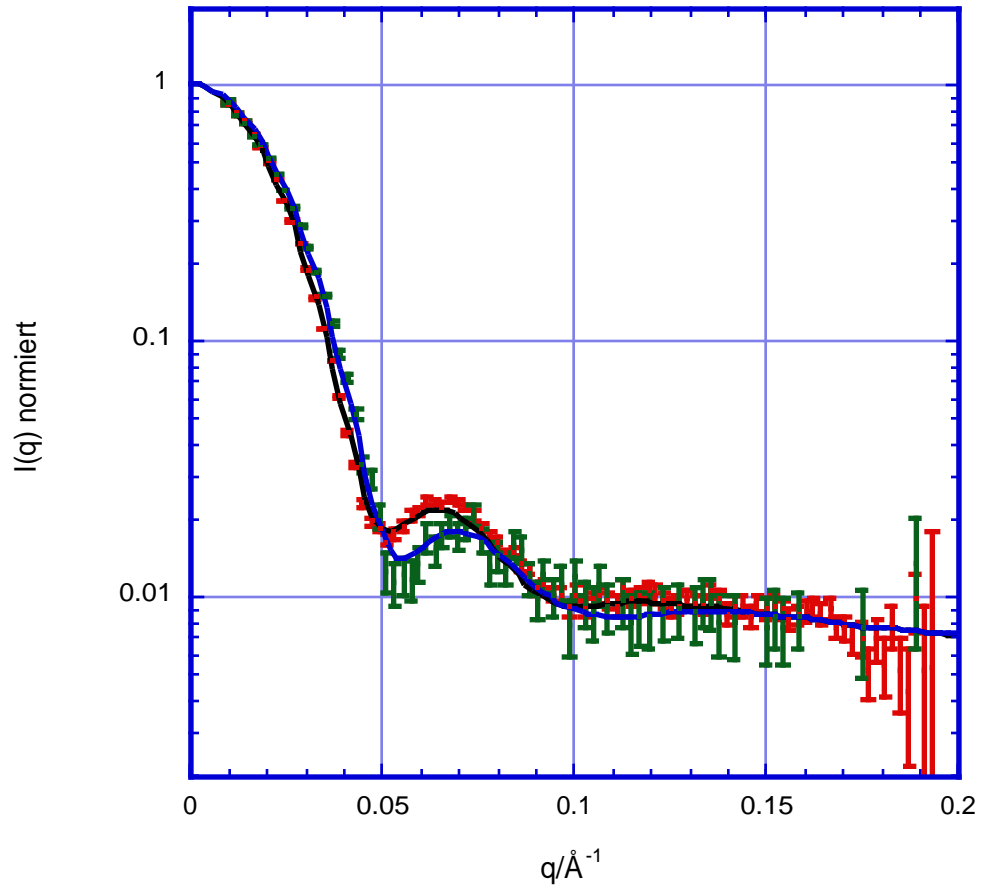


Abb. 2.27: experimentelle Streukurven von  $\alpha\beta$ -Thermosom und Modellkurven, 20°C  
 rot:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Puffer ( $\text{H}_2\text{O}$ ) ohne Nukleotid, grün: physiologischer Puffer ( $\text{D}_2\text{O}$ ) ohne Nukleotid  
 schwarz: Modell offen, blau: Modell geschlossen  
 Aus Gründen der besseren Darstellung bei großem  $q$  wurde der Untergrund nicht vollständig von den experimentellen Kurven abgezogen; zu den Modellkurven wurde eine Konstante addiert.



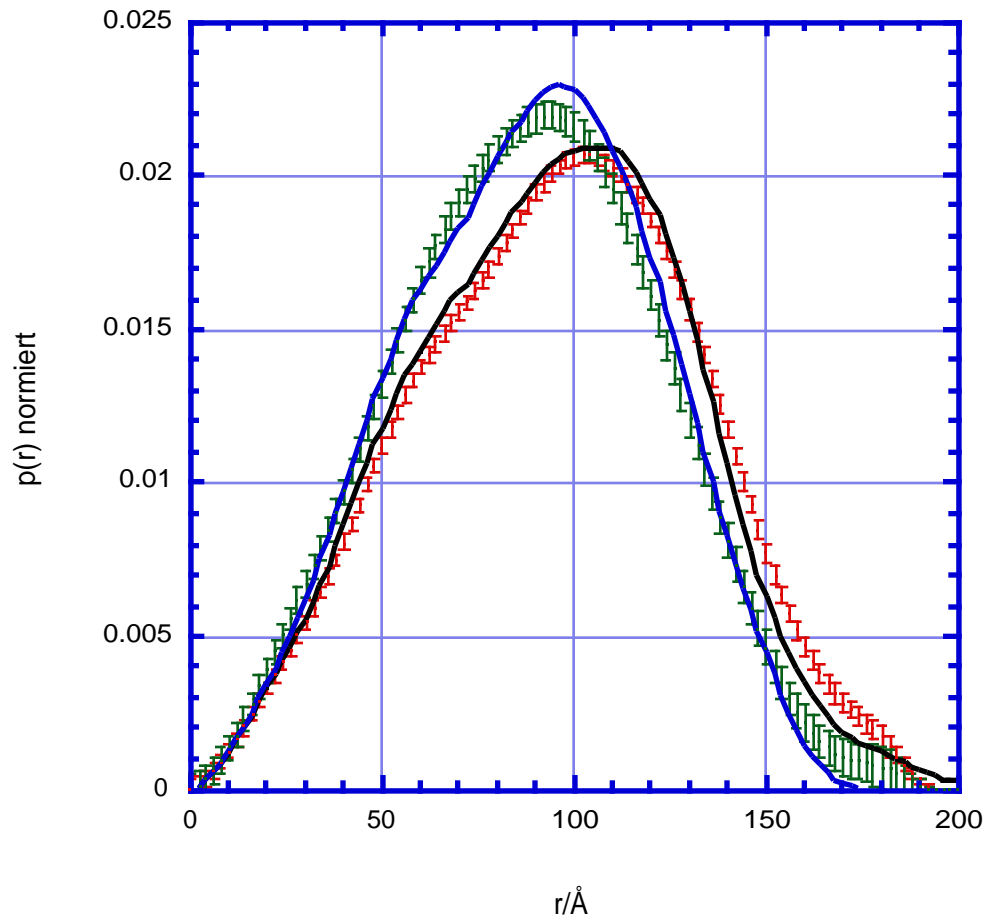


Abb. 2.28: experimentelle  $p(r)$ -Funktionen von  $\alpha\beta$ -Thermosom und Modellkurven 20°C  
 rot:  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ -Puffer ohne Nukleotid, grün: physiologischer Puffer ohne Nukleotid schwarz: Modell offen,  
 blau: Modell geschlossen

## Nukleotidabhängigkeit der Konformation bei $\alpha\beta$ -Thermosom (Gutsche et al., 2000, Current Biology)

In weiteren Messungen wurde untersucht, ob nicht nur Salze, wie in der Kristallstruktur, sondern auch Nukleotide eine Auswirkung auf die der Konformation haben.

Nukleotid	Puffer	Konformation
keines	D <sub>2</sub> O	offen
ATP	D <sub>2</sub> O	offen
ADP-AlF	D <sub>2</sub> O	offen
ADP, 2M P <sub>i</sub>	H <sub>2</sub> O	geschlossen
ADP	D <sub>2</sub> O	offen
2M P <sub>i</sub>	D <sub>2</sub> O	offen

Tabelle 2.3:

Konformation von  $\alpha\beta$ -Thermosom mit verschiedenen Nukleotiden bei 20°C

Auf die Darstellung von Streukurven wurde hier verzichtet, da diese im Rahmen der Fehler mit denen aus Abb. 2.27 praktisch identisch sind. Die Schließung von ADP-P<sub>i</sub>-Thermosom ist allerdings etwas weniger ausgeprägt als bei der Messung mit NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>-Puffer. Dies weist darauf hin, daß in der Probe eine Mischung vorliegen könnte, bei der die geschlossene Konformation zwar dominiert, aber auch noch andere Konformationen zum Signal beitragen.

Wie man aus Tabelle 2.3 entnehmen kann, tritt – im Gegensatz zu GroEL – erst bei der Spaltung von ATP eine Schließung auf. Einigen Messungen zeigten – allerdings mit Datenunterschieden am Rand der Fehlergrenzen – eine etwas weitere Öffnung von ATP-Thermosom und AMP-PNP-Thermosom als von Apo-Thermosom und ADP-Thermosom. Dieser Eindruck wurde zwar von den zweidimensionalen EM-Aufnahmen bestätigt, konnte aber in späteren Messungen nicht mehr reproduziert werden.

Bei zahlreichen Experimenten mit Thermosom trat leichte Aggregation auf, die sich in einem Anstieg der Streukurven zu niedrigem  $q$  hin und in leichten Schultern der  $p(r)$ -Funktionen bei großen Abständen zeigten. Das Minimum der Streukurve bei  $0.05\text{\AA}^{-1}$  sowie das darauffolgende Nebenmaximum waren davon jedoch nicht betroffen, der vordere und der mittlere Teil der  $p(r)$ -Funktionen ebenfalls nicht. Da teilweise für die indirekte Fouriertransformation die Punkte der Streukurve bei kleinem  $q$  nicht berücksichtigt wurden enthalten die Werte für die hohen Abstände der  $p(r)$ -Funktionen (etwa das letzte Viertel) nur noch sehr wenig echte Information. Aufgrund dieser Problematik erscheint eine Berechnung von Gyrationradien über Guinierplots oder über die  $p(r)$ -Funktionen für Thermosom nicht sinnvoll.

## Temperatur- und Nukleotidabhängigkeit der Konformation bei $\alpha\alpha$ - und $\alpha\beta$ -Thermosom (Gutsche et al., 2001)

Unter den von Trent et al. beschriebenen Bedingungen (Inkubation bei 55°C mit Mg und ATP) konnten zwar keine Filamente oder Aggregate beobachtet werden, aber überraschenderweise Thermosom in geschlossener Konformation. Dies veranlasste uns, die Konformation des Proteins in Abhängigkeit von Mg-Konzentration und Temperatur zu untersuchen.

Die Ergebnisse der Messungen kann man Tabelle 2.4 entnehmen.

$\alpha\alpha$ , 10 mM Mg, 25°C	o	$\alpha\beta$ , 10mM Mg, 25°C	o
$\alpha\alpha$ , 25 mM Mg, 25°C	o	$\alpha\beta$ , 25mM Mg, 25°C	o
$\alpha\alpha$ , 40 mM Mg, 25°C	o	$\alpha\beta$ , 40mM Mg, 25°C	o
$\alpha\alpha$ , 10 mM Mg, 50°C	o	$\alpha\beta$ , 10mM Mg, 50°C	o
$\alpha\alpha$ , 25 mM Mg, 50°C	o	$\alpha\beta$ , 25mM Mg, 50°C	o
$\alpha\alpha$ , 40 mM Mg, 50°C	o	$\alpha\beta$ , 40mM Mg, 50°C	o
$\alpha\alpha$ , 10 mM Mg, 5mM AMP-PNP, 25°C	o	$\alpha\beta$ , 10 mM Mg, 5 mM AMP-PNP, 25°C	o
$\alpha\alpha$ , 25 mM Mg, 20mM AMP-PNP, 25°C	o	$\alpha\beta$ , 25 mM Mg, 20 mM AMP-PNP, 25°C	o
$\alpha\alpha$ , 40 mM Mg, 35 mM AMP-PNP, 25°C	o	$\alpha\beta$ , 40 mM Mg, 35 mM AMP-PNP, 25°C	o
$\alpha\alpha$ , 10 mM Mg, 5 mM AMP-PNP, 50°C	g	$\alpha\beta$ , 10 mM Mg, 5 mM AMP-PNP, 50°C	g
$\alpha\alpha$ , 25 mM Mg, 20 mM AMP-PNP, 50°C	g	$\alpha\beta$ , 25 mM Mg, 20 mM AMP-PNP, 50°C	g
$\alpha\alpha$ , 40 mM Mg, 35 mM AMP-PNP, 50°C	g	$\alpha\beta$ , 40 mM Mg, 35 mM AMP-PNP, 50°C	g
$\alpha\alpha$ , 10 mM Mg, 5 mM ATP, 25°C	o	$\alpha\beta$ , 10 mM Mg, mM 5 ATP, 25°C	o
$\alpha\alpha$ , 25 mM Mg, 20 mM ATP, 25°C	o	$\alpha\beta$ , 25 mM Mg, mM 20 ATP, 25°C	o
$\alpha\alpha$ , 40 mM Mg, 35 mM ATP, 25°C	o	$\alpha\beta$ , 40 mM Mg, mM ATP, 25°C	o
$\alpha\alpha$ , 10 mM Mg, 5 mM ATP, 50°C	g	$\alpha\beta$ , 10 mM Mg, 5 mM ATP, 50°C	g
$\alpha\alpha$ , 25 mM Mg, 20 mM ATP, 50°C	g	$\alpha\beta$ , 25 mM Mg, 20 mM ATP, 50°C	g
$\alpha\alpha$ , 40 mM Mg, 35 mM ATP, 50°C	g	$\alpha\beta$ , 40 mM Mg, 35 mM ATP, 50°C	g
$\alpha\alpha$ , 40 mM Mg, 35 mM ADP, 50°C	o	$\alpha\beta$ , 40 mM Mg, 35 mM ADP, 50°C	o

Tabelle 2.4:

Konformation von Thermosom  $\alpha\alpha$  und  $\alpha\beta$  in D<sub>2</sub>O-Puffer bei verschiedenen Bedingungen, o: offen, g: geschlossen (Aus technischen Gründen wurden die Proben bei 50°C statt bei 55°C gemessen.)

Innerhalb dieser Daten kann weder eine Abhängigkeit von der Magnesium-Konzentration noch ein Unterschied zwischen  $\alpha\alpha$  und  $\alpha\beta$  beobachtet werden. Bei den Proben mit ATP konnte eine Temperaturabhängigkeit gezeigt und reproduziert werden, das Protein ist bei

25°C offen und bei 50°C geschlossen (Abb. 2.29 und 2.30, man beachte vor allem das Maximum bei  $0.07\text{\AA}^{-1}$ ). Dieser Übergang tritt sowohl beim Erwärmen als auch beim Abkühlen der Probe auf. Auch beim nicht hydrolysierbaren ATP-Analogon AMP-PNP ist dieser Effekt zu beobachten, er ist also unabhängig von der ATP-Hydrolyse.

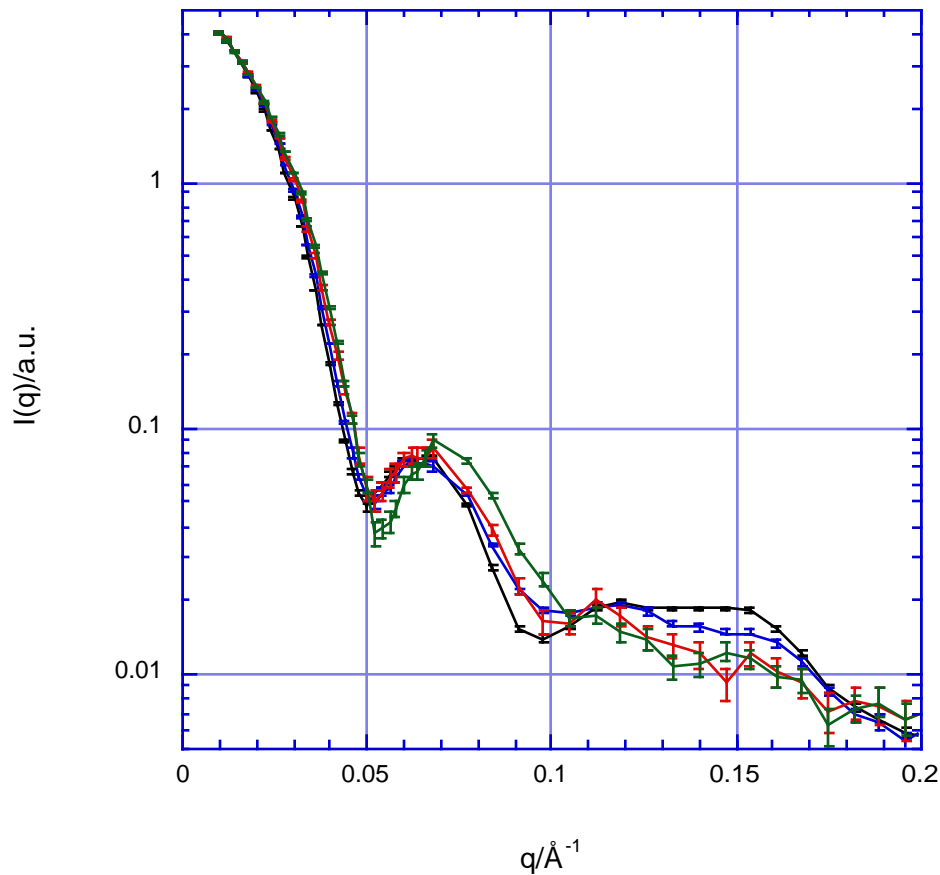


Abb. 2.29:  $\alpha\beta$ -Thermosom mit 25mM Mg C ohne Nukleotid und mit ATP bei 25°C und 50°C in  $\text{D}_2\text{O}$ -Puffer

schwarz: 25°, ohne Nukleotid blau: 55°, ohne Nukleotid rot: 25°, 20mM ATP grün: 55°, 20mM ATP

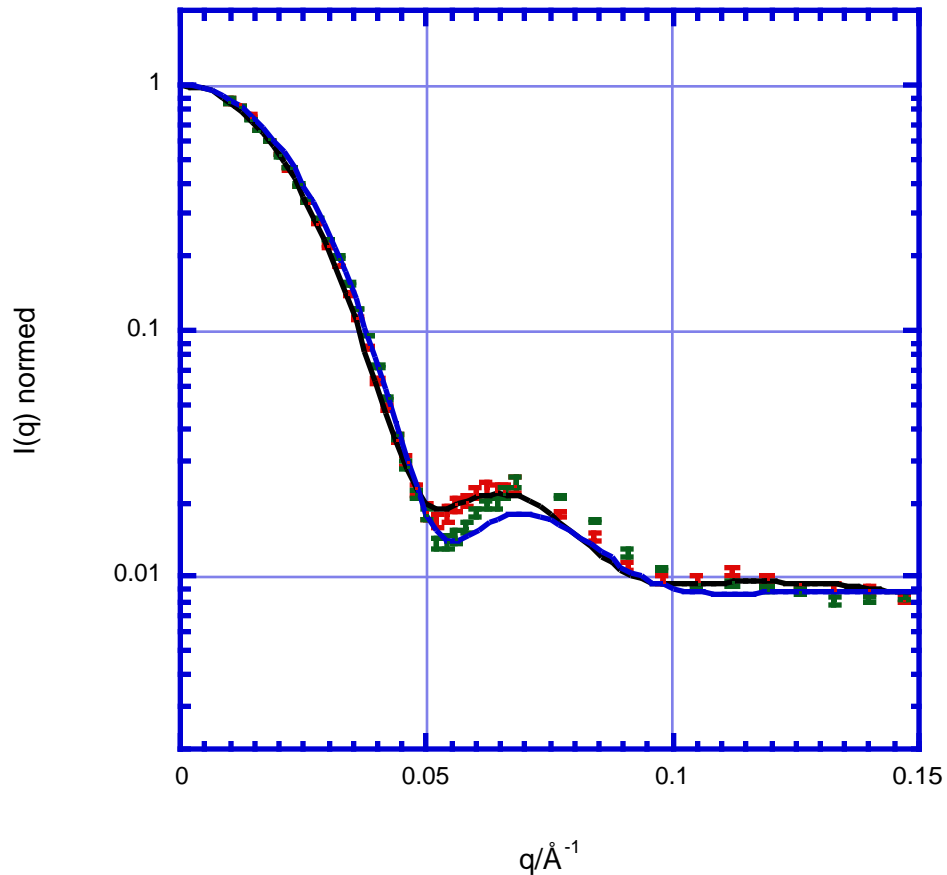


Abb. 2.30:  $\alpha\beta$ -Thermosom mit 25mM Mg und 20mM ATP bei 25°C und 50°C in D<sub>2</sub>O-Puffer

rot: 25° grün: 55° schwarz: Modell geschlossen blau: Modell offen

Aus Gründen der besseren Darstellung bei großem q wurde der Puffer nicht vollständig von den experimentellen Kurven abgezogen, zu den Modellkurven wurde eine Konstante addiert.

Unter denselben Bedingungen wurde eine Serie von Proben mit  $\alpha\alpha$ -Thermosom gemessen. Dabei konnte kein Unterschied im Vergleich zu  $\alpha\beta$ -Thermosom festgestellt werden.

Für den Puffer mit hoher Phosphatkonzentration konnte jedoch einer der Vergleiche nicht durchgeführt werden:  $\alpha\alpha$ -Thermosom mit ADP aggregierte, auch in H<sub>2</sub>O-Puffer und Anwesenheit von Reagentien, die für die bekanntermaßen Proteinaggregation verhindern (z.B. Glucose oder Imidazol).

## *Diskussion:*

### *Kristallstruktur versus EM-Struktur*

Ausgangspunkt der Experimente war die Diskrepanz zwischen der geschlossenen Kristallstruktur und den in der Elektronenmikroskopie beobachteten offenen Konformationen des Thermosoms. Wir konnten zeigen, daß die Schließung des Proteins im Kristall nicht wie vorgeschlagen durch ADP-AlF<sub>x</sub>, einem Analogon des ATP-Hydrolysezustandes bedingt ist. Der Grund für die Schließung des Chaperonins sind die SO<sub>4</sub>-Ionen im Kristallisationspuffer; in einem „physiologischen“ Puffer mit ADP-AlF<sub>x</sub> bleibt das Thermosom offen. Dies zeigt die Wichtigkeit von Lösungsstreuung trotz ihrer geringen Auflösung, da die Kleinwinkelstreuung als einzige Methode erlaubt, die Struktur großer Moleküle in Puffern mit beliebigen Salzquantitäten und -qualitäten zu untersuchen. Man kann natürlich nur eingeschränkt von einem physiologischen Puffer sprechen, da es sehr schwierig ist, Salzkonzentrationen und pH *in vivo* zu ermitteln, und da in der Zelle eine hohe Konzentration anderer Moleküle, vor allem von Proteinen und Lipiden vorhanden ist.

### *Nukleotidabhängigkeit der Konformation bei $\alpha\beta$ -Thermosom*

Mit Experimenten zur Nukleotidabhängigkeit der Konformation von Thermosom konnte im physiologischen Puffer eine weitere Bedingung mit geschlossener Konformation gefunden werden, und zwar wenn der Puffer ADP und eine hohe Konzentration von Phosphat (2M) enthält. Es kann angenommen werden, daß unter diesen Bedingungen an der Nukleotidbindungsstelle des Proteins statt des dritten kovalent gebundenen Phosphats ein freies Phosphation sitzt und damit die Konformation dem Zustand unmittelbar nach der Spaltung von ATP entspricht. Dies erlaubte uns, ein strukturelles Modell für den ATPase-Zyklus von Thermosom vorzuschlagen, bei dem im Unterschied zu GroEL die Schließung des Chaperonins nach der Spaltung von ATP eintritt (siehe allerdings die Modifikation im nächsten Kapitel).

Auf der Basis dieser Beobachtungen konnte Frau Irina Gutsche Puffer- und Nukleotidbedingungen für EM-Untersuchungen auswählen die mittlerweile den ATPase-Zyklus mit größerer Auflösung darstellen (Gutsche et al., 2000, FEBS). Dies zeigt ein weiteres Potential der Kleinwinkelstreuung: da grobe strukturelle Daten in kurzer Zeit gewonnen werden können, erlaubt dies eine Vorauswahl für die mit hohem Arbeitsaufwand bei der Bildverarbeitung verbundene Elektronenmikroskopie .

### *Nukleotidabhängigkeit der Konformation bei $\alpha\beta$ -Thermosom*

Eine Versuchsreihe mit einer Serie verschiedener Nukleotidbedingungen und Temperaturen, erlaubte nicht, wie ursprünglich erwartet, einen Unterschied in der Nukleotidabhängigkeit der Konformationen von  $\alpha\alpha$ - und  $\alpha\beta$ -Thermosom zu zeigen. Dafür wurde eine Temperaturabhängigkeit der Konformation gefunden:

ATP-Thermosom zeigt bei 25°C eine offene, bei 50°C aber eine geschlossene Struktur. Diesen Ergebnissen zufolge ähnelt der strukturelle ATPase-Zyklus von Thermosom bei physiologischer Temperatur dem GroE-Zyklus: bei GroEL führt die Bindung von ATP

zur Bildung eines Komplexes mit GroES und damit zu einer geschlossenen Struktur, die den Einschluß eines Substratproteins erlaubt. Bindet ATP bei hohen Temperaturen an das Thermosom, schließt sich ebenfalls der Innenraum des Hohlzylinders, allerdings nicht durch die Bindung eines Co-Chaperonins, sondern durch starke Bewegungen der apikalen Domänen des Proteins.

Bei 25°C zeigt Thermosom jedoch immer noch eine, wenn auch geringere, ATPase-Aktivität (persönliche Mitteilung, I. Gutsche). Für den Zusammenhang mit der Konformation bieten sich zwei Erklärungen an. Einerseits ist ein Unterschied der Reaktionszyklen in Abhängigkeit von der Temperatur denkbar. Zum anderen ist es denkbar, daß zwei ATP-Thermosom-Konformationen, mit temperaturabhängigem Gleichgewicht parallel existieren. Im Reaktionszyklus würden jeweils zunächst die geschlossene und dann die offene Konformation durchlaufen. Bei den Gleichgewichtsmessungen könnte die jeweils überwiegende Struktur das Signal bestimmen.

Unsere Ergebnisse zeigen auch allgemein, daß es grundsätzlich wichtig ist, die Struktur von Thermophilen-Proteinen bei physiologischer Temperatur zu untersuchen. Wenn ähnliche temperaturabhängige Konformationsänderungen von Thermophilen in der Regel nicht diskutiert werden, dürfte dies jedoch kaum am seltenen Auftreten dieses Phänomens liegen. Wahrscheinlicher ist, daß diese Eigenschaft von Proteinen nicht entdeckt wird, weil die Standardmethoden nicht für Messungen bei hoher Temperatur geeignet sind – das Einfrieren von Protein ausgehend von hohen Temperaturen, ohne das Protein dabei zu verändern ist ungleich schwieriger, als Lösungsstreuung, wenn nicht unmöglich. Vermutlich aus diesem Grund wurde bisher keine Reproduktion der SANS-Ergebnisse mit EM veröffentlicht.

Ausgehend von den hier geschilderten Ergebnissen bieten sich eine Reihe weiterer Experimente an:

Die Energiebarriere zwischen offener und geschlossener Konformation könnte mit „temperature-jump“-Versuchen bestimmt werden. Die Messung des Strukturübergangs in Abhängigkeit von der Temperatur in Kombination mit Aktivitätsmessungen würde klären, inwieweit eine Korrelation zwischen der Struktur und der enzymatischen Aktivität besteht. Gleichzeitig könnte dabei anhand der Form des Nebenminimums in der Streukurve bestimmt werden, ob sich bei diesem Übergang langsam das Mischungsverhältnis ändert, oder ob bei einer charakteristischen Temperatur eine schnelle Konformationsänderung eintritt.

### **2.3.2. Aggregationseffekte in Lösung**

(Gutsche et al., 2001)

Bei Dialyse von Thermosom gegen einen  $\text{NH}_4\text{SO}_4\text{-D}_2\text{O}$ -Puffer oder bei Mischung mit diesem Puffer ergaben sich milchig-trübe Lösungen. Es hatten sich also Strukturen gebildet, die mindestens so groß sind wie die Wellenlänge des sichtbaren Lichts, also mehrere Tausend Ångström. Die Streukurven dieser Lösungen zeigen bei niedrigem  $q$  ein für Aggregate typisches Verhalten. Minimum und Nebenmaximum bei  $0.03\text{Å}^{-1}$  weisen jedoch auf eine lokale Ordnung bei kürzeren Abständen hin. Diese Aggregate wurden später auch bei anderen Pufferbedingungen gefunden. Im Fall von  $\alpha\alpha$ -Thermosom mit ADP und 1M Phosphat verhinderten sie die Untersuchung der Proteinkonformation.

Es stellte sich zum einen die Frage, ob diese Strukturen einem Anfang von Kristallbildung entsprechen, dessen Untersuchung u.U. zum allgemeinen Verständnis der Kristallisation beitragen könnte. Zum anderen lag ein Vergleich mit den in mehreren elektronenmikroskopischen Arbeiten (Trent, 1997, 1998, Yaoi) beschriebenen Thermosomfilamenten nahe.

Die beobachteten Streukurven können mit Filamenten nicht befriedigend modelliert werden, Netzwerke aus Filamenten führten nicht zum Erfolg.

Ringe aus mehreren Thermosomen sind bessere Modelle für Abstände bis etwa 500Å (Abb. 2.31, 2.32). Auch wenn es noch deutliche Diskrepanzen zwischen diesen Modellkurven und den experimentellen Daten gibt, verzichteten wir auf Versuche einer genaueren Modellierung: zum einen ist keine homodisperse Verteilung von Molekülen in der Lösung zu erwarten, zum anderen wäre der Aufwand zu Modellierung von Netzwerken sehr hoch. Ringstrukturen und Netzwerkstrukturen wurden auch mit EM beobachtet, allerdings waren sie nicht reproduzierbar und traten auch unter Bedingungen auf, bei denen sie mit SANS nicht gefunden werden konnten.

Eine Annäherung an die experimentellen Daten gelang ebenfalls mit Modellen von Minikristallen aus zwei Proteinschichten. In diesem Fall müßte das Maximum in den Streukurven bei  $0.037 \text{ \AA}^{-1}$  als Bragg-Peak interpretiert werden.

Gegen eine in vivo-Existenz der beobachteten Strukturen spricht auch als weiteres Argument ein Experiment, in dem sich die bei 25°C beobachteten Aggregate bei höheren Temperaturen auflösten. Nach einer erneuten Abkühlung der Probe bildeten sich wieder Aggregate. Trotz einer guten Temperaturkontrolle war dieses Experiment jedoch nicht reproduzierbar.



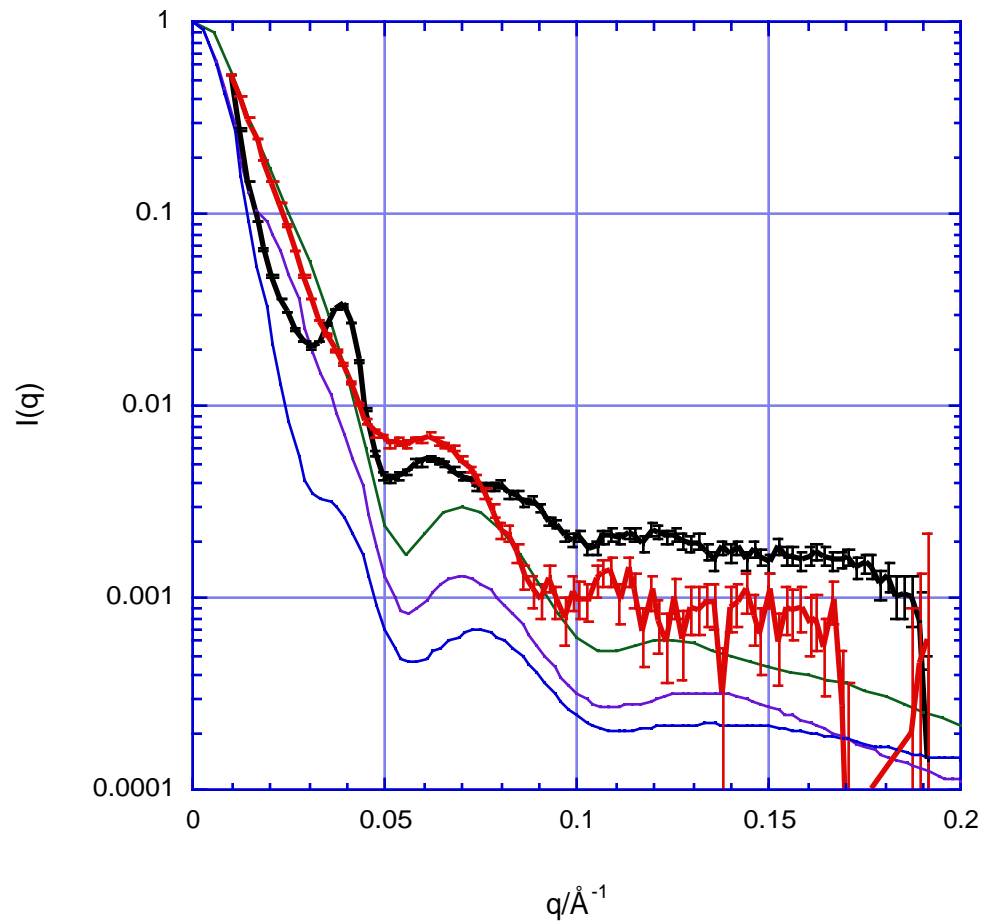


Abb. 2.31:  $\alpha\alpha$ -Thermosom-Aggregate, Modelle und experimentelle Daten  
 rot:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -  $\text{H}_2\text{O}$ -Puffer, schwarz: AMP-PNP, 1M Phosphat,  $\text{H}_2\text{O}$ -Puffer  
 grün: lineares Filament, violett: Ring aus acht Einheiten, blau: Minikristall aus zwei Schichten (genauer:  $3 \times 3 \times 2$ )  
 Die Kurven sind willkürlich auf ein gleiches  $I(0)$  normiert.

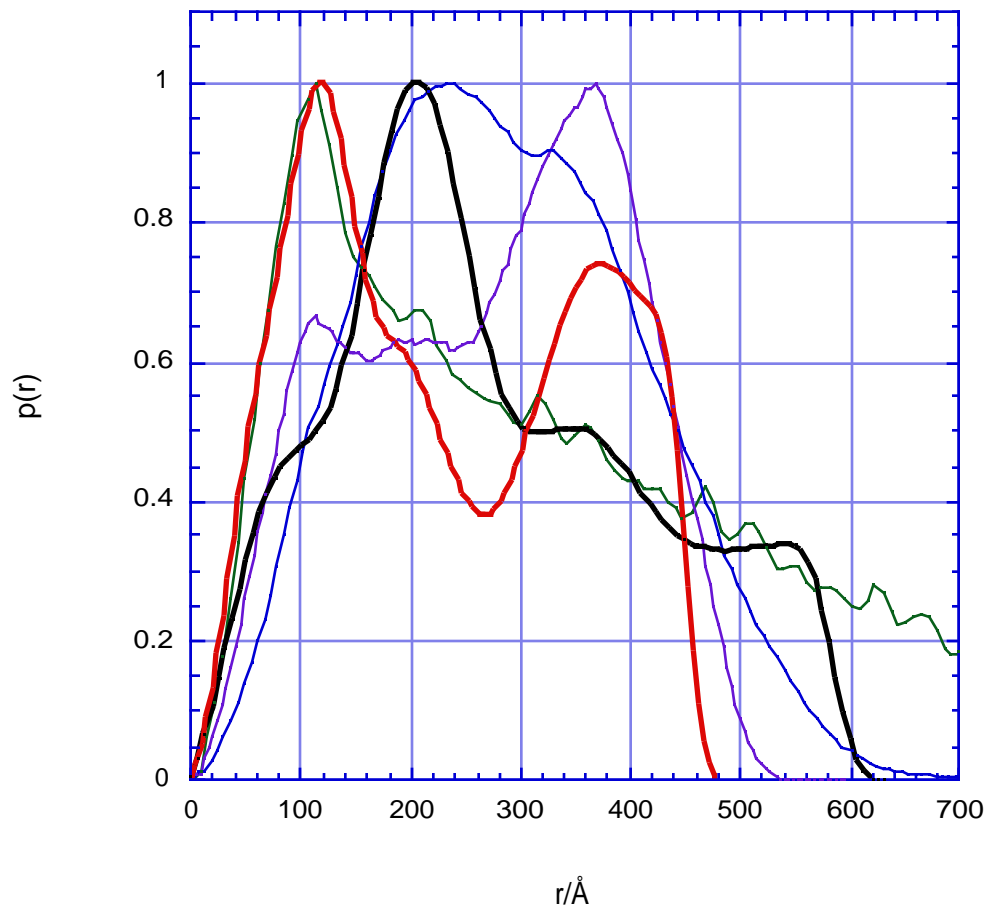


Abb. 2.32:  $\alpha\alpha$ -Thermosom-Aggregate, Modelle und experimentelle Daten  
 rot: experiment, :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -  $\text{H}_2\text{O}$ -Puffer, schwarz: AMP-PNP, 1M Phosphat,  $\text{H}_2\text{O}$ -Puffer  
 grün: lineales Filament, violett: Ring aus acht Einheiten, blau: Minikristall aus zwei  
 (genauer:  $3 \times 3 \times 2$ ) Schichten  
 Die Kurven sind willkürlich auf die Höhe des Maximums normiert.

### *Diskussion:*

Unseren experimentellen Daten und Modellrechnungen zufolge kann die Anordnung von Thermosom zu linearen Filamenten ausgeschlossen werden. Zudem scheint die hohe physiologische Temperatur von *Thermoplasma acidophilum* Thermosomstrukturen höherer Ordnung eher zu destabilisieren. Die Hypothese, das Protein könnte am Aufbau des Cytoskeletts beteiligt sein, muß deshalb als widerlegt betrachtet werden. Vermutlich sind die beobachteten Strukturen ein Salzartefakt der Elektronenmikroskopie, wie es schon bei GroEL aufgetreten ist (Harris et al.). Inwieweit die Aggregate aus Minikristallen, Ringstrukturen oder Gemischen daraus bestehen, konnte letztendlich nicht geklärt werden. Da weder Ringe noch Minikristalle biologisch relevant sind, wurde die weitere Untersuchung dieser Fragestellung nicht als prioritär betrachtet.

Die bei einer Probe beobachtete reversible Temperaturabhängigkeit der Aggregation deutet auf sehr geringe thermodynamische und kinetische Unterschiede zwischen gelösten und aggregiertem Thermosom hin. Vermutlich können in den untersuchten Pufferbedingungen sehr kleine Modifikationen verschiedener Parametern, wie Salzzusammensetzung, pH und Temperatur zu Bildung oder Auflösung von Aggregaten führen, wobei das Zusammenspiel dieser Parameter noch nicht verstanden ist.

### 3. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Neutronenkleinwinkelstreuung ein Beitrag zum Verständnis der Mechanismen von Chaperoninen geleistet. In unserer Arbeitsgruppe wurden von Dr. Manfred Rößle komplementäre Röntgenstreuexperimente an GroEL durchgeführt. Nach Abschluß des Projekts soll nun kritisch beleuchtet werden, welche Vorteile und Grenzen die Kleinwinkelstreuung bei der Beantwortung offener Fragen an diesem System hat. Es ist dabei auch interessant zu betrachten, welche Möglichkeiten und Stärken SANS im Vergleich zu anderen Methoden hat.

Unsere SANS-Versuche an Chaperoninen lassen sich in drei Gruppen einteilen:

- statische Experimente am Thermosom (also ohne Co-Chaperonin) ohne Substratprotein zur Untersuchung der Konformation in Abhängigkeit von Pufferzusammensetzung, Temperatur und Nukleotiden
- statische Experimente an GroEL allein, mit Co-Chaperonin und/oder Substratprotein
- zeitaufgelöste Experimente an GroEL mit Co-Chaperonin oder Substratprotein

#### 3.1. Statische Experimente ohne Co-Chaperonin oder Substratprotein

Zu Beginn des Projektes war von Frau Dr. Renata Stegmann die Nukleotidabhängigkeit der GroEL-Struktur mit SANS untersucht worden (Stegmann, Dissertation). Die beobachteten Änderungen der Streukurve lagen am Rand der statistischen Relevanz, eine strukturelle Interpretation war nicht möglich. Die Veröffentlichung von EM-Aufnahmen (Roseman et al., Abb. 1.3) erklärte dieses Ergebnis: bei der Bindung von Nukleotiden ändert GroEL zwar seine Struktur, aber hauptsächlich durch seitliche Verdrehungen der apikalen Domänen. Von der Kleinwinkelstreuung mit ihrer niedrigen Auflösung kann dies praktisch nicht erfaßt werden kann. Zeitaufgelöste SAXS-Messungen zeigten leichte Änderungen des Gyrationradius von etwa  $0,3\text{\AA}$  bei der ATP-Bindung. Für SANS-Experimente liegt dies innerhalb der Fehlergrenze, abgesehen davon wäre der hohe Aufwand, nur um eine eindimensionale Größe zu finden, für statische Experimente wohl nicht gerechtfertigt.

Im Fall des Thermosoms war schon vor Beginn der SANS-Versuche die Existenz von zwei Konformationen mit wesentlich größeren Unterschieden bekannt (Abb. 1.7). Aufgrund von Modellrechnungen wußten wir, daß sich die entsprechenden Streukurven deutlich unterscheiden würden. Die Frage war, wann welche der Strukturen in Lösung auftritt. Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen, daß die Konformation von Pufferzusammensetzung, Nukleotid und Temperatur abhängen. Ein  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Puffer, wie er für die Kristallisation benutzt wurde, ADP mit hohen Phosphat-Konzentrationen sowie ATP in Kombination mit hohen Temperaturen ( $50^\circ\text{C}$ ) führen zu einer Schließung des Thermosoms.

Diese Schließung zeigt sich in der Streukurve vor allem in einer deutlichen Verschiebung des charakteristischen Nebenmaximums zu größeren q-Werten und einer Verschiebung des Maximums der  $p(r)$ -Funktion zu kleineren Abständen. Eine Berechnung des Streumassenradius ist weniger sinnvoll, weil viele Thermosom-Proben Anzeichen von leichter Aggregation aufwiesen. In der Regel haben diese zwar keine Auswirkungen im

Bereich mittlerer und höherer  $q$ -Werte, verfälschen aber die Streukurve bei niedrigen  $q$ -Werten, bei denen Information über den Streumassenradius enthalten ist. Abb. 3.1 zeigt als Beispiel, wie in einer Guinierauftragung die ersten Punkte der Thermosom-Streukurve zu kleinerem  $q$  hin immer stärker ansteigen. Dies ist ein Indiz für Aggregationen in der Probe. In diesem Fall sind die Aggregate noch nicht so stark, daß sie die Daten unbrauchbar machen. Die ersten Punkte der Streukurve müssen jedoch bei der Dateninterpretation und der indirekten Fouriertransformation außer acht gelassen werden.

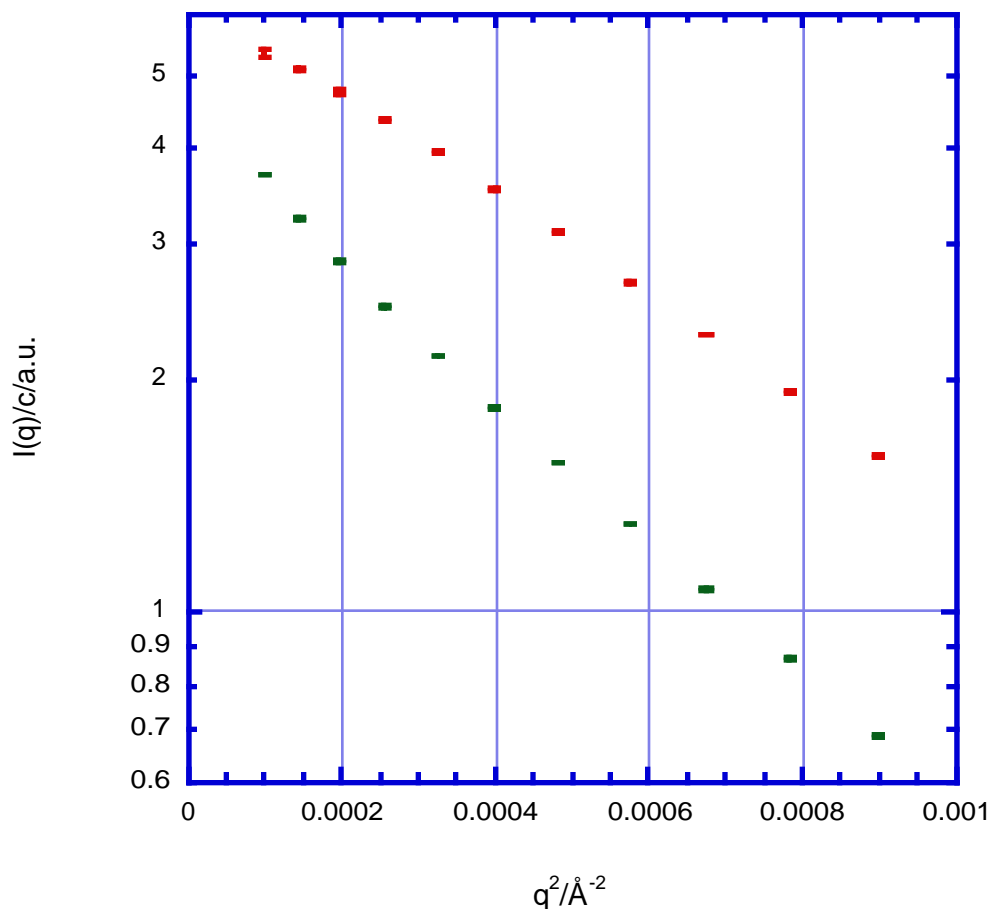


Abb. 3.1: Guinierauftragung der Streukurven eines GroEl-GroES-ADP-Komplexes (rot) und von  $\alpha\alpha$ -Thermosom (grün), parallel unter gleichen Bedingungen gemessen

Auf der Basis der SANS-Experimente konnte gezeigt werden, daß die Konformation des Thermosoms in der Kristallstruktur durch unphysiologische Salzbedingungen zustande kommt. Zudem konnten erste Modelle für den strukturellen Reaktionszyklus des Chaperonins vorgeschlagen werden.

Mit der Kleinwinkelstreuung kann eine große Zahl verschiedener Pufferbedingungen in kurzer Zeit getestet werden. Dies erlaubte es erfolgversprechende Bedingungen für später durchgeführte EM-Versuche am Thermosom (I. Gutsche) auszuwählen. Erste Ergebnisse mit zweidimensionaler EM bestätigten mit SANS gefundene Konformationsänderungen; sie zeigten aber auch, daß bei den Bedingungen, in denen Streukurven auf offene Konformationen hingewiesen hatten, mehrere voneinander verschiedene Strukturen auftreten. Es muß also davon ausgegangen werden, daß das Thermosom ähnlich wie GroEL Konformationen mit deutlichen Unterschieden besitzt, die fast identische Streukurven ergeben. Ab-initio-Berechnungen, bei denen nur ausgehend von Streukurven möglichst genaue Strukturvorschläge gefunden werden sollen (Svergun et al., 1991, 1996), müssen bei Berücksichtigung solcher Beispiele als problematisch bewertet werden: die Streukurve selbst enthält keine Information darüber, wieviele Konformationen mit welchen Gewichtungen die Probe enthält. Auch wenn eine Struktur gefunden wird, die die Streukurve gut erklären würde, kann, wenn keine weiteren Informationen vorliegen nicht ausgeschlossen werden, daß in Wirklichkeit eine Mischung von zwei oder mehr Strukturen anderer Konformation vorliegt.

Die bei den den Messungen am Thermosom verwendeten Pufferbedingungen mit hohen Salzkonzentrationen und/oder hohen Temperaturen, stellen für die Kleinwinkelstreuung kein Problem dar. Es ist fraglich, ob sie in der Elektronenmikroskopie zu verwirklichen wären: hohe Salzkonzentrationen erschweren ein sauberes Einfrieren der Probe und der Abkühlungsvorgang vor allem aus hohen Temperaturen kann die Proben verändern.

Zu Recht kann die Frage gestellt werden, ob die Messungen am Thermosom nicht ebenso gut mit Röntgenstrahlen durchführbar gewesen wären. In Anbetracht der beschriebenen Probleme mit Aggregaten ist die bessere Datenqualität von Neutronen bei kleineren  $q$ -Werten irrelevant. SAXS-Messungen an Laborröntgenquellen wären jedoch wenig erfolgversprechend. Die Meßzeiten dieser Instrumente wären um etwa eine Größenordnung länger, als bei den von uns verwendeten SANS-Instrumenten. Damit wäre die Aktivität des Proteins nicht mehr sichergestellt. In Kombination mit schwachem Fluß und niedriger Brillanz ist der niedrige Kontrast bei SAXS-Experimenten ein wichtiges Argument gegen den Einsatz von Laborröntgenquellen. Mißt man an Synchrotrons, ist das Problem des schwachen Flusses gelöst und man kann mit einem hochbrillanten Strahl arbeiten. Das Argument des einfacheren Zugangs und des niedrigeren finanziellen Aufwands gilt dann aber nicht mehr.

Ein großer Vorteil der Neutronen ist in jedem Fall die Abwesenheit von Stahlschäden, die eine mehrfache Verwendung von Proben bei unterschiedlichen Bedingungen ermöglicht. Vor allem aber ist SANS vor der Perspektive von künftigen Versuchen mit deuteriertem Substratprotein interessant.

### **3.2. Statische Experimente an GroEL mit Co-Chaperonin oder Substratprotein**

In einer Reihe von Versuchen mit Co-Chaperonin oder Substratprotein wurden mit Hilfe der selektiven Markierung von Einzelementen in Proteinkomplexen Komplexe aus protoniertem und deuteriertem Protein untersucht. Nachdem uns teildeuteriertes GroEL und GroES zur Verfügung stand, waren die Voraussetzungen für Messungen mit hoher Datenqualität gegeben: in den meisten Versuchen wurde angestrebt, einen der Bestandteile unsichtbar zu machen. Im Fall unseres teildeuterierten Proteins gilt dies für

Puffer mit 99% D<sub>2</sub>O, womit der inkohärente Untergrund durch Protonen in der Probe minimiert ist. Die Daten haben also ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis, damit kann entweder die Meßzeit einer Probe um etwa eine Größenordnung reduziert werden oder bei gleicher Meßzeit können Daten mit wesentlich besserer Statistik gewonnen werden.

Eine Reihe erfolgreicher Messungen gelang an Komplexen aus GroEL und Co-Chaperonin. In Proben aus unsichtbarem GroEL und sichtbarem GroES konnten charakteristische Signale von Hantelstrukturen nachgewiesen werden. So wurde zum einen der Abstand zwischen den beiden GroES-Molekülen im Football-Komplex (200 Å) überprüft, zum anderen konnte die Häufigkeit der Bildung des Komplexes quantitativ bestimmt werden. Somit wurde am Beispiel des Football-Komplexes gezeigt, wie mit Hilfe von SANS Bindungskonstanten in Proteinkomplexen gemessen werden können. Die meisten bekannten Bindungskonstanten von GroEL-GroES-Komplexen wurden z.B. mit SPR (Oberflächenplasmonen-Resonanz) gemessen, einer Methode, die die Probe stark verändert, weil dabei entweder GroEL oder GroES an eine Oberfläche fixiert werden muß.

Neben der Information über Abstände und Konzentrationen des Football-Komplexes deuten nach den Ergebnissen von Modellrechnungen dessen Streukurven auf Konformations-änderungen von GroES bei der Bindung an GroEL im hin.

Das Phagen-Co-Chaperonin GP31 bildete mit GroEL ebenfalls Football-Komplexe. Da die Größennormierung in der Neutronenstreuung wesentlich einfacher ist als in der EM, konnte erstmals experimentell gezeigt werden, daß in vergleichbaren Komplexen GP31 etwa 5 Å weiter von GroEL entfernt ist als GroES.

Messungen an Proben mit GroEL und Substratprotein stellten sich als äußerst schwierig heraus, hauptsächlich weil die Substratproteine von Chaperoninen gemäß deren Funktion vor der Bindung denaturiert werden mußten. In den meisten Fällen bildeten sich dadurch Aggregate. Da in der Kleinwinkelstreuung die Intensität des Signals bei gleicher Molarität proportional zum Quadrat der Masse eines Moleküls ist, überdeckten die Aggregate häufig die Streukurven der zu untersuchenden Komplexe. Eine mögliche Lösung dieses Problems ist die Reinigung der Proben von Aggregaten durch Molekularsiebe. Messungen mit der MBP-Mutante Y283D zeigten jedoch, daß in diesem Fall beispielsweise keine Doppelbindung des Substratproteins mehr beobachtet werden kann. Die Reinigung stellt demnach eine Selektion auf stark gebundene Komplexe dar. Auch mit zeitaufgelösten Messungen zur Beobachtung der Assoziation von Substratprotein an GroEL sind solche Reinigungen unvereinbar. In einigen Fällen konnten auch nach unmittelbarer Mischung von GroEL und MBP- Y283D Proben mit nur niedrigen Konzentrationen an Aggregaten gebildet werden, deren Präparation war jedoch nicht reproduzierbar.

Im Idealfall müßten also Substratproteine gefunden werden, die auch bei Denaturierung keine Aggregate bilden. Naturgemäß ist das schwer, weil GroEL Proteine eben gerade unter den Bedingungen bindet, in denen sie am ehesten aggregieren können. Die Citrat-Synthase G276A ist jedoch ein Beispiel für ein Protein ohne übermäßige Aggregation. Sie ist aber ebenfalls für SANS-Experimente nur eingeschränkt verwendbar, da sie nicht eingefroren werden kann. Damit ist es schwierig, die Verfügbarkeit von Meßzeit mit der von guten Proben zu koordinieren.

### 3.3 Kinetische Experimente

GroES und GP31 sind für die meisten biochemischen und biophysikalischen Methoden, kaum oder überhaupt nicht zu unterscheiden. Dies erschwert Experimente, bei denen analog zu den Vorgängen in der Zelle GroES und GP31 in einer Probe um die Bindung an GroEL kompetitieren. Besondere Probleme bereitet die schwierige Unterscheidbarkeit für kinetische Messungen, da hierbei die Statistik der Daten durch die zeitliche Auflösung des Experiments beschränkt ist. Durch die gleichzeitige Verwendung von deuteriertem GroES und protoniertem GP31 in einer Probe konnte dieses Problem gelöst werden. Für zeitaufgelöste Messungen wurden Komplexe aus protoniertem GroEL und protonierte Co-Chaperonin vorgeformt. Nach Zugabe eines Überschusses von teildeuteriertem GroES verdrängte dieses das protonierte Co-Chaperonin. Durch Zeitaufgelöste Messungen dieser Verdrängung konnten unterschiedliche Dissoziationsraten der beiden Co-Chaperonine nachgewiesen werden.

. Die Proben wurden manuell gemischt und in Standardküvetten gemessen, da auf diese Weise vier Reaktionen parallel beobachtet werden konnten. Dadurch wurde die Meßzeit um dem Faktor vier reduziert, was das Experiment an einem SANS-Instrument mit nur wenig verfügbarer Meßzeit erst ermöglichte. Wegen der langen Dauer der Kinetik konnte auch die Einzelstreu Kurven entsprechend lang gemessen werden, sie haben also über den gesamten  $q$ -Bereich eine gute Qualität. Die Kurven werden jedoch von nur zwei Strukturen dominiert, Bullet-Komplexen mit sichtbaren bzw. mit unsichtbarem Co-Chaperonin. Beide Strukturen haben jeweils charakteristische, unterschiedliche Größen für  $R_G$  und  $I(0)$ . Für diese spezielle Situation wird die Dateninterpretation erleichtert, wenn zu jedem Zeitpunkt nur eine dieser Größen betrachtet wird. Die Information der Nullwinkelstreuung ist präziser, da die Abschätzung des  $R_G$  nur von der Steigung der Streukurve bei kleinen Winkeln bestimmt wird,  $I(0)$  aber auch von deren Höhe. Noch besser die Nullwinkelstreuung ist dessen Quadratwurzel, weil diese direkt proportional zum mittleren Molekulargewicht der sichtbaren Komplexbestandteile ist.



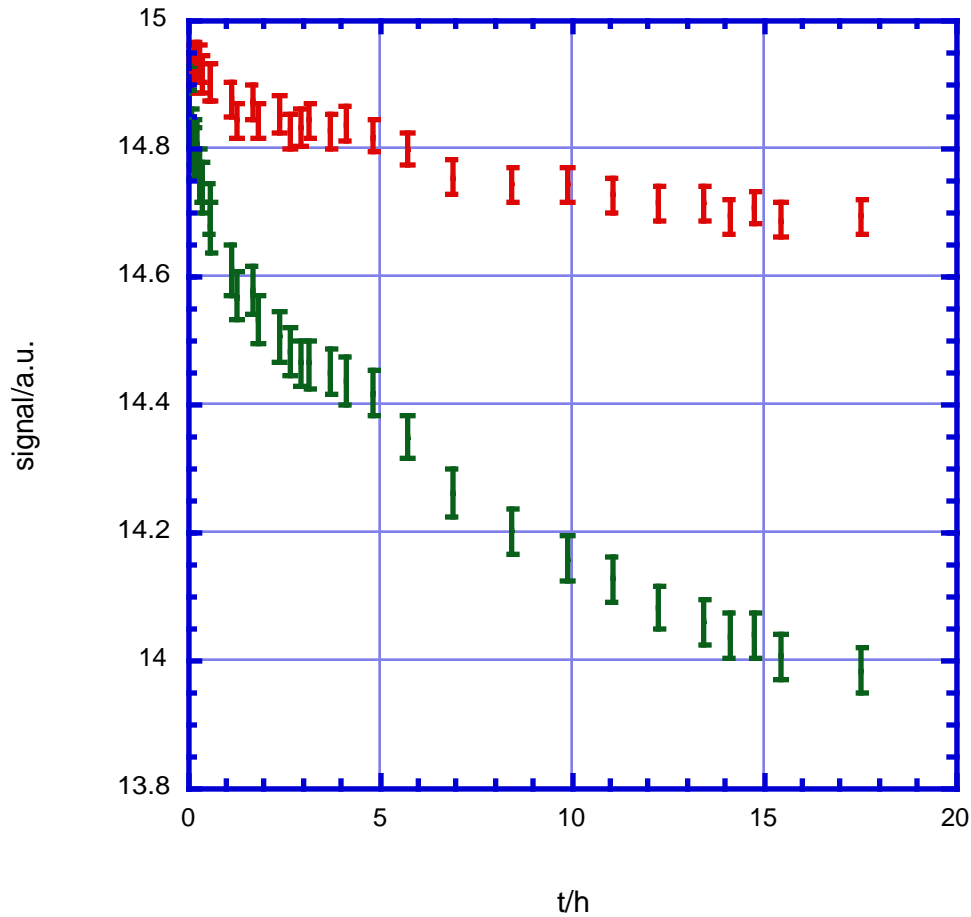


Abb. 3.2: Vergleich der Datenqualität für die Parameter  $R_G$  und  $I(0)$  in einer kinetischen SANS-Messung (vorgeformter Komplex aus protoniertem GroEL und GroES mit ADP, chasing mit teildeutertem GroES in 99% $D_2O$ )

Stopped-flow-Versuche zur Untersuchung der Bildung von Bullet-Komplexen und Football-Komplexen aus GroEL und GroES waren weniger erfolgreich. Vorversuche zeigten, daß die Statistik der Streukurven bei Aufsummierung äquivalenter Messungen Auflösungen bis zu 1s erlauben sollte. Zu reproduzierbaren kinetischen Ergebnissen führten diese Versuche leider nicht. Die Gründe dafür sind noch nicht verstanden. Auf Grund theoretischer Erwägungen und von zeitaufgelösten SAXS-Messungen wären Änderungen der Streukurven im Sekundenbereich zu erwarten. Die Probleme könnten mit dem Mischvorgang zusammenhängen: wegen der niedrigen Brillanz der Neutronen wird mit einem sehr großen Strahlquerschnitt gearbeitet. Um ein Maximum des Neutronenflusses auszunutzen werden Meßzellen mit großem Querschnitt und Volumen verwendet. Die Mischung der großen Probenvolumina bereitet Schwierigkeiten, ebenso

wie der Übergang der Probe von einem dünnen Schlauch in eine wesentlich breitere Küvette.

Nach wie vor gibt es eine Reihe offener Fragen zum GroE-System, die mit kinetischen SANS-Messungen in Verbindung mit den Möglichkeiten von Isotopenmarkierung und Kontrastvariation beantwortet werden könnten. So sollte es beispielsweise möglich sein, eine transiente Bildung des Football-Komplexes nachzuweisen. Es ist also zu hoffen, daß die instrumentellen Probleme bald gelöst werden.

## 4.Material und Methoden

### 4.1. theoretische Grundlagen der Kleinwinkelstreuung

(Williams et al., Jacrot, Glatter, 1982, Hamouda)

Vorbemerkung: SAXS und SANS haben das gleiche Grundprinzip, es werden aber eine Reihe analoger Größen unterschiedlich benannt. Im folgenden wird die Terminologie der Neutronenstreuung benutzt.

Trifft eine Welle auf ein punktförmiges Teilchen, so wird sie von diesem gleichmäßig in alle Richtungen gestreut. Im Fall der Röntgenstreuung stellt ein kohärenter Photonenstrahl die Welle dar und die Elektronenhülle eines Atoms ist das Streuzentrum. In der Neutronenstreuung ist ein einzelnes Neutron die Welle und ein Atomkern das Streuzentrum.

Die einfallende ebene Welle läßt sich mit der Gleichung

$$\psi(z) = \exp(ik_0z) \quad (4.1)$$

beschreiben, wobei  $k_0$  für den Wellenvektor des Photons bzw. Neutrons steht.

$$(k_0=2\pi/\lambda, \lambda \text{ entspricht der Wellenlänge}) \quad (4.2)$$

Das Verhältnis zwischen gestreutem Photonen/Neutronenstrom ( $I = n/t$ ) und einfallenden Fluß ( $\Phi = n'/At$ ) wird als Streuquerschnitt  $\sigma$  bezeichnet, für ihn gilt:

$$\sigma = 4\pi b^2 \quad (4.3)$$

und

$$\sigma = \frac{I}{\Phi} = \frac{n/t}{n'/At}, \quad (4.4)$$

dabei steht  $b$  für die Streulänge,  $I$  für den Strom,  $\Phi$  für den Fluß,  $n$  für die Zahl der einfallenden Neutronen,  $n'$  für die Zahl der gestreuten Neutronen,  $A$  für die Querschnittsfläche des Strahls und  $t$  für das betrachtete Zeitintervall. Bei der Definition des Flusses müßte theoretisch auch noch der Raumwinkel des Strahls berücksichtigt werden, er kann hier jedoch vernachlässigt werden, da der Strahl bei unseren Experimenten kollimiert ist und der Raumwinkel keine Einheit hat.

Bei elastischen Streueignissen sind Wellenlänge von einfallendem und gestreutem Strahl gleich, bei der inelastischen Streuung nehmen Photonen oder Neutronen Energie auf oder geben sie ab und ändern damit ihre Wellenlänge. Inelastische Streuung spielt bei Neutronen eine wichtige Rolle und kann Informationen über Bewegungsvorgänge innerhalb von Molekülen liefern. Für die Kleinwinkelstreuung wird ihr Beitrag jedoch im allgemeinen vernachlässigt.

Weiterhin muß zwischen kohärenter und inkohärenter Streuung unterschieden werden: Bei der kohärenten Streuung bleibt die Phase der Welle erhalten, bei der inkohärenten Streuung geht sie verloren. Inkohärente Streuung kann daher keine räumliche Strukturinformation liefern. In der Neutronenstreuung tritt sie jedoch in einem hohen Maß auf und trägt damit zum einem gleichmäßigen Untergrund in allen Raumwinkeln bei. Daher ist für das Ergebnis eines Kleinwinkel-experiments nur der kohärente Anteil nützlich mit

$$\sigma_{\text{koh}} = 4\pi b_{\text{koh}}^2. \quad (4.5)$$

Wenn nun ein kohärenter Photonenstrahl oder ein Neutron auf mehrere Streuzentren trifft, so ergeben sich Interferenzeffekte zwischen den resultierenden Wellen, durch die die Streuintensität richtungsabhängig wird. Im Fall von Proteinlösungen ist keine räumliche Orientierung bevorzugt, es liegt eine isotrope Streuung mit einem radialsymmetrischen Streubild vor. Zur Beschreibung der Streuwinkel verwendet man in der Kleinwinkelstreuung den Streuvektor  $q$  mit

$$\vec{k} = \vec{k}_0 + \vec{q} \quad (4.6)$$

und

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta \quad (\theta \text{ ist die Hälfte des Streuwinkels}). \quad (4.7)$$

In der Literatur werden Streuvektoren auch als  $h$ ,  $Q$  oder  $2\pi s$  abgekürzt.

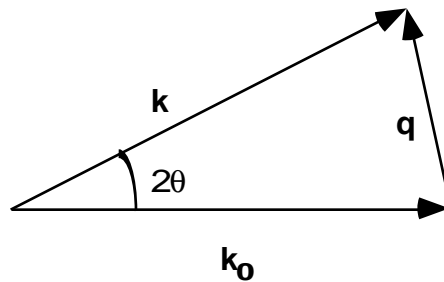


Abb. 4.1: vektorielle Darstellung eines Streueignisses

Für kleine Winkel  $2\theta$  gilt:

$$q = \frac{2\pi\theta}{\lambda} \quad (4.8)$$

Zur Beschreibung der Winkelabhängigkeit der kohärenten Streuung an Partikeln eignet sich der differentielle Streuquerschnitt:

$$\frac{d\sigma_{\text{koh}}}{d\Omega}(\vec{q}) = \frac{I_s(\vec{q})}{I_0 N S} \quad (4.9)$$

$d\Omega$  ist dabei der infinitesimale Teil eines Raumwinkels,  $I_s(\Omega)$  die von der Probe in einen Raumwinkel gestreute Intensität,  $I_0$  der einfallende Neutronenfluß und  $S$  die Fläche des Probenquerschnitts.

Für  $N$  gilt:

$$N = N_A \frac{d}{M} e \quad (4.10)$$

mit  $N_A$  als der Avogadrozahl,  $d$  der Dichte der Probe,  $M$  dem Molekulargewicht eines Probenmoleküls und  $e$  der Probendicke.  $N$  entspricht der Anzahl der Partikel im Strahlquerschnitt.

$\frac{d\sigma}{d\Omega}$  wird üblicherweise in  $\text{cm}^2$  angegeben.

Häufig ist wenn vom differentiellen Streuquerschnitt gesprochen wird,  $\frac{d\sigma/d\Omega}{V}$  mit dem Probenvolumen  $V$  gemeint, die Einheit ist dann  $\text{cm}^{-1}$ .

Es gilt weiterhin für die Summe der Streubeiträge aller Atompaaare  $i, j$  mit den Streulängen  $b_i$  und  $b_j$  und den Positionen  $r_i$  und  $r_j$ :

$$\frac{d\sigma_{\text{coh}}}{d\Omega}(q) = \sum_{i,j} b_i b_j \exp(iq(r_i - r_j)) \quad (4.11)$$

Bei gleicher Massenkonzentration ist damit  $\frac{d\sigma}{d\Omega}(0)$  proportional zum Molekulargewicht, bei gleicher Partikelzahl proportional zum Quadrat des Molekulargewichts.

Mit der Streukurve ist über eine Fouriertransformation die Abstandsverteilungsfunktion  $p(r)$  verbunden:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega}(q) = 4\pi \int_0^{D_{\text{max}}} p(r) \frac{\sin qr}{qr} dr \quad (4.12)$$

hierbei ist  $D_{\text{max}}$  der größte auftretende Abstand innerhalb der untersuchten Struktur.

$p(r)$  ist definiert als:

$$p(r) = r^2 \iint \Delta\rho(r') \Delta\rho(r' - r) dV' \quad (4.13)$$

$\Delta\rho$  steht hier für den Kontrast an Punkt  $r$ .

$\rho$  steht für die Streulängendichte in einem Volumenelement  $V$  mit  $\rho = \frac{\sum b_i}{V}$ . (1.14)

$p(r)$ , eine Autokorrelationsfunktion, beschreibt die Wahrscheinlichkeit, zwei Volumenelemente mit ihrer Streulängendichte gewichtet mit einem Abstand  $r+dr$  anzufinden.

Theoretisch ist die in Streukurve und Abstandsverteilungsfunktion enthaltene Information äquivalent. In der Praxis ist eine direkte Fouriertransformation einer experimentellen Streukurve aus mehreren Gründen nicht möglich: aus technischen Gründen können sehr kleine Winkel nicht gemessen werden, z.T. werden Streukurven kleiner Winkel auch durch Aggregationseffekte gestört. Außerdem haben experimentelle Kurven natürlich immer Meßfehler, die die Strukturinformation verfälschen. In der Neutronenstreuung stellt die Verschmierung der Meßkurve ein zusätzliches Problem dar (siehe Abschnitt D22).

Die Darstellung von SAS-Ergebnissen in Form einer  $p(r)$ -Funktion ist jedoch wesentlich anschaulicher als die Streukurve. Daher wurden Methoden der indirekten Fouriertransformation entwickelt, die trotz dieser Probleme die Berechnung von  $p(r)$ -Funktionen ermöglicht. In diesem Fall müssen jedoch Annahmen über bestimmte Parameter gemacht werden, die  $p(r)$ -Funktion enthält also unter Umständen nicht nur die Strukturinformation der Streukurve sondern auch die für die indirekte Fouriertransformation notwendigen zusätzlichen Parameter. Daher sollten die Interpretationen von SAS-Experimenten nicht ausschließlich an der  $p(r)$ -Funktion festgemacht werden.

Ein Parameter, der im Fall der Partikelstreuung ohne weitere Annahmen durch SAS ermittelt werden kann, ist der Gyrationradius bzw. Streumassenradius ( $R_G$ ), der über zwei Formeln bestimmt werden kann (Glatter, 1982):

Für den innersten Teil der Streukurve gilt die Formel

$$\lim_{q \rightarrow 0} (I(q)) = I(0) \exp\left(-\frac{q^2 R_G^2}{3}\right) . \quad (4.15)$$

In einer Auftragung von  $\log(I)/q^2$  (ein "Guinier-Plot") kann der  $R_G$  aus der Steigung abgelesen werden.

Eine andere Möglichkeit ist die Bestimmung über die Abstandsverteilungsfunktion nach der Beziehung

$$R_G^2 = \frac{\int_0^\infty p(r) r^2 dr}{2 \int_0^\infty p(r) dr} \quad (4.16)$$

Aus der Nullwinkelstreuung Molekulargewicht oder Konzentration bestimmt werden, wenn der jeweils andere Parameter bekannt ist:

$$M = \frac{N_A}{c \Delta \rho_m^2} \frac{d\sigma}{d\Omega} (q = 0) \quad (4.17)$$

$M$  ist das Molekulargewicht,  $N_A$  die Avogadrozahl,  $c$  die Konzentration, und  $\Delta \rho$  der Kontrast des Moleküls mit

$$\Delta \rho_m = (\rho_m - \rho_b) \bar{v} , \quad (4.18)$$

dabei stehen  $\rho_m$  für die Streulängendichte des betrachteten Moleküls,  $\rho_b$  für die Streulängendichte des Lösungsmittels und  $\bar{v}$  für die Größe des betrachteten Volumenelements.

## 4.2. Aufbau des SANS-Diffraktometers D22 am ILL (Büttner, ed., The yellow book)

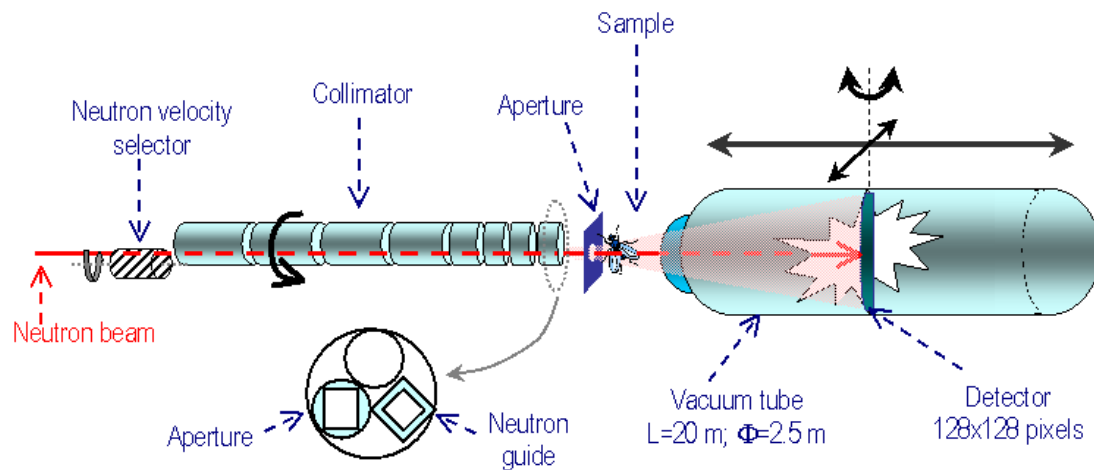


Abb. 4.2: Schema von D22

Die Neutronen des ILL werden im Hochflußreaktor des Instituts in der folgenden Kernreaktion erzeugt (Carlile):



(die 2.5 Neutronen auf der rechten Seite der Gleichung stehen für die sind ein Durchschnittswert der verschiedenen Einzelreaktionen)

Das Brennelement des Reaktors ist zu 93% mit U-235 angereichert. Es ist von  $\text{D}_2\text{O}$  als Moderator umgeben, dieses bremst die Neutronen auf thermische Energien um 25 meV ab und ermöglicht damit ein Aufrechterhalten der Kettenreaktion. Gleichzeitig dient das  $\text{D}_2\text{O}$  als Reflektor und trägt damit dazu bei, den Kern kritisch zu halten.

Für die Kleinwinkelstreuung wie auch für viele andere Methoden werden Neutronen mit noch niedrigeren Energien und damit größere Wellenlängen benötigt. Dazu wird ein Teil der Neutronen in einer kalten Quelle, einem Tank mit flüssigem  $\text{D}_2$ , auf Energien in der Größenordnung von 3 meV abgekühlt. Über Neutronenstrahlleiter werden sie dann zu den Experimenten geführt.

Die Energie der Neutronen, die aus der kalten Quelle kommen, wird durch eine Maxwellverteilung beschrieben. Aus dieser breiten Verteilung muß ein monochromatischer Strahl der gewünschten Wellenlänge herausgefiltert werden. Dies geschieht durch einen schraubenförmigen Geschwindigkeitsselektor, der über seine Drehfrequenz Neutronen einer gewählten Wellenlänge mit einer Halbwertsbreite von 10% auswählt.

Anschließend durchläuft der Strahl ein Kollimationssystem. Hier kann unter mehreren Kollimationsröhren ausgewählt werden, um den richtigen Kompromiss zwischen Fluß und Strahlkonvergenz zu finden.

Nach dem Austritt aus dem Kollimationssystem kann der Strahl die Probe durchqueren, von der er dann gestreut wird. Die gestreuten Neutronen werden dann von einem quadratischen He-3-Detektor mit 128x128 Zellen registriert. In diesem werden über eine Kernreaktion ( $\text{He-3} + n \rightarrow \text{H-3} + p$ ) Ladungen erzeugt, die dann elektronisch registriert werden können. Eine Totzeit von 0.9µs nach jedem Zählereignis beschränkt die Zählrate auf 100000 Neutronen pro Sekunde (bei 10% Totzeit). Verantwortlich für diese Totzeit sind Elektroneffekte. Lokale Totzeiteffekte aufgrund physikalischer Effekte fallen kaum ins Gewicht. Der Detektor kann innerhalb der Röhre längs und seitlich verschoben werden, um den von ihm erfaßten Winkelbereich zu modifizieren. Vor dem Detektor können Strahlfänger („Beamstops“) aus B<sub>4</sub>C angebracht werden, um Beschädigungen des Detektors durch zu hohe lokale Zählraten zu vermeiden. Als Fluß-Monitor ist ein schwacher Detektor mit einer einzigen Zelle vor der Kollimation montiert.

Neutronenleiter, Kollimation und Detektorröhre sind unter Vakuum, um eine Streuung der Neutronen an der Umgebungsluft zu vermeiden.

Mehrere Faktoren dieses Instrumentaufbaus führen zu einer Verschmierung der Daten: Der Strahl hat eine endliche Ausdehnung. Nach dem Austritt aus dem Neutronenleiter divergiert er innerhalb des kritischen Reflektionswinkels des Leiters (ca. 1° bei einer Wellenlänge von 10Å)

Durch die Breite der Wellenlängenverteilung werden vor allem Daten bei großen q-Werten verschmiert.

Theoretisch trägt auch die endliche Größe der Detektorzellen zur Verschmierung bei. In der Praxis kann dieser Effekt jedoch vernachlässigt werden, da er wesentlich geringer ist, als die beiden erstgenannten.

### 4.3. Instrumentelle Parameter bei den SANS-Messungen

Die meisten Messungen wurden am SANS-Diffraktometer D22 am ILL in einem q-Bereich 0.01 Å<sup>-1</sup> to 0.19 Å<sup>-1</sup> durchgeführt. Dieser wurde üblicherweise mit einer Wellenlänge von 8Å und einem Detektorabstand von 4m bei seitlicher Versetzung des Detektors um 390 mm erreicht. Für Messungen in D<sub>2</sub>O-Puffern wurde in der Regel eine Kollimation von 4m gewählt, für Messungen in H<sub>2</sub>O-Puffern oder mit hohem H<sub>2</sub>O-Anteil eine Kollimation von 5.6.

Einige Messungen wurden mit jeweils zwei Detektorabständen an D11 am ILL durchgeführt, mit den folgenden Parametern:

$q = 0.01\text{-}0.24 \text{ Å}^{-1}$ ,  $\lambda = 8\text{Å}$ , Detektorabstand = 4 m mit einer Kollimation von 4m und Detektorabstand = 1.1 m mit einer Kollimation von 2.5m

Zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente hatten D22 wie D11 Totzeiten von etwa 2µs. An D22 wurde die Totzeit zwischenzeitlich auf 0.9µs reduziert.



Einmal, für einen Kontrollversuch am Thermosom, wurde am Instrument PAXE am LLB in Saclay, Frankreich gemessen, mit folgenden Parametern:  $q = 0.02 \text{ \AA}^{-1}$  bis  $0.2 \text{ \AA}^{-1}$ ,  $\lambda = 6 \text{ \AA}$ , Detektor versetzt.

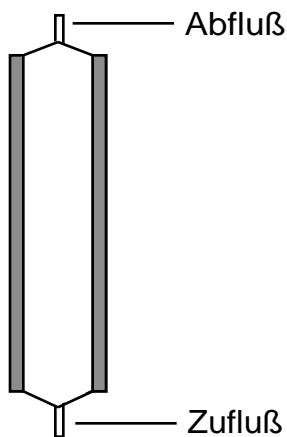
Eine Messung an der GroEL single-ring-Mutante wurde am Instrument V4 am HMI in Berlin durchgeführt:

$q = 0.01\text{-}0.24 \text{ \AA}^{-1}$ ,  $\lambda = 8 \text{ \AA}$ , Detektorabstände 4 m und 1 m

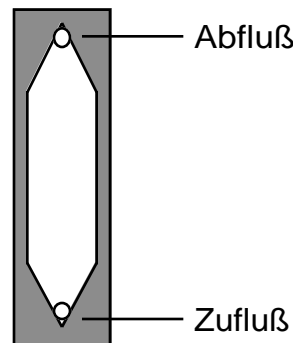
Für die statischen Messungen wurden, soweit nicht anders angegeben, runde Quarküvetten (Hellma, 120-QS) mit einem Innendurchmesser von 9 mm und einer Innendicke von 1 mm verwendet. Die langsamen Kinetiken wurden ebenfalls in diesen Küvetten gemessen, hierbei wurden die Proben jeweils zu Beginn des Experiments manuell gemischt.

Für die schnellen Kinetiken wurden drei selbstgebaute stopped-flow-Apparate und ein kommerzielles Gerät (SFM-3, Bio-Logic, Claix/Isère, Frankreich) verwendet. Die Geräte hatten zwei bzw. drei von Schrittmotoren angetriebene Spritzen. In allen Fällen wurde der Mischvorgang elektronisch gesteuert.

Bei den Messungen am SFM-3-Apparat kam eine speziell angefertigte Küvette verwendet (Abb. 4.3 a), hierbei fließt die Probe in der Ebene der Küvette zu und ab. Für die anderen die schnellen kinetischen Messungen wurden Hellma-Durchflußküvetten (137-QS, Abb. 4.3.b) verwendet, in diesen Fall fließt die Probe  $90^\circ$  zur Ebene der Küvette zu und ab. Bei beiden Küvetten betrug die Zelldicke 1 mm und der Innendurchmesser 9 mm.



a) Küvette für SFM-3



b) Hellma 137-QS

Abb. 4.3: Küvetten für stopped-flow-Messungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Proben bei  $25^\circ\text{C}$  thermostatisiert.

## 4.4. Datenbehandlung

Das direkte Ergebnis einer SAS-Messung ist ein üblicherweise zweidimensionales Detektorbild, dem man die Zahl der Treffer pro Detektorzelle entnehmen kann (Abb. 4.4).

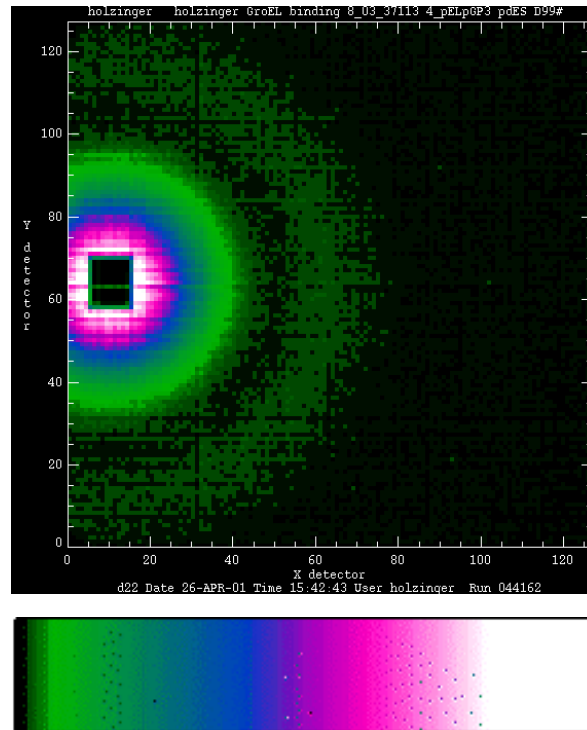


Abb. 4.4: Detektorbild D22 mit Intensitätsskala:  
GroEL-GP31-ADP-Komplex (protoniert, in D<sub>2</sub>O-Puffer)

Dieses Detektorbild wird zunächst radial gemittelt, d.h. es wird aus ihm mit Hilfe der Formel  $q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta$  eine Streukurve errechnet (Ghosh et al.). Die Intensität der resultierenden Streukurve muss um die Totzeit des Detektors korrigiert werden. Die Totzeit der am ILL verwendeten SANS-Detektoren wird nicht durch lokale Effekte der Detektorzellen, sondern durch die Elektronik dominiert. Für diese von uns berücksichtigte Gesamtzeit gilt dann :

$$n = n' / (1 - n' \tau)$$

dabei ist n die tatsächliche Zählrate, n' die gemessene und  $\tau$  die Totzeit.

### -Transmissionen

Inkohärente Streuung und bei nicht-organischen Proben zum Teil Absorption führen zu einer Abschwächung des Strahls. Zur Korrektur dieses Effekts muß der Transmissionsfaktor bestimmt werden. Hierzu mißt man mit Hilfe eines Strahlabschwächers die Intensität des verbleibenden Primärstrahls für die Probe und eine Referenz (üblicherweise die Leerküvette). Der Transmissionsfaktor entspricht, nach

Totzeitkorrektur und Division um den jeweiligen Monitor, dem Quotienten dieser beiden Werte,.

-Standartauswertung

Um zu korrekten Streukurve der Probe zu kommen, müssen mehrere Effekte korrigiert werden:

Um Flußschwankungen (und unterschiedliche Meßzeiten) auszugleichen werden die Intensitäten aller Streukurven durch den jeweiligen Monitor geteilt.

Der Detektor hat einen sehr geringen elektronischen Untergrund, weiterhin existiert ein Hallenuntergrund durch Streustrahlung, die von Nachbarinstrumenten und vom Strahlausgang des SANS-Instruments selbst herrühren kann. Dieser Untergrund wird gemessen, indem eine Platte aus Cadmium oder B<sub>4</sub>C (Borcarbid) in den Strahl gestellt wird, die die Neutronen an der Probenposition absorbiert.

Der Probenbehälter trägt selbst geringfügig zur Streuung bei, es muss also ein Spektrum der Leerküvette bestimmt werden.

Geringe lokale Unterschiede in der Effizienz der Detektorzellen werden korrigiert, indem durch das Spektrum einer Probe mit einer flachen Streukurve geteilt wird. In dem von uns betrachteten q-Bereich kann dazu Wasser verwendet werden.

Es ergibt sich zusammenfassend die folgende Formel:

$$I(q) = \frac{(I_s(q)/M_s - T_s \cdot I_{EC}(q)/M_{EC} - (1 - T_s)I_{Cd}(q)/M_{Cd})}{(I_w(q)/M_w - T_w \cdot I_{EC}(q)/M_{EC} - (1 - T_w)I_{Cd}(q)/M_{Cd})} \quad (4.19)$$

mit  $I_s(q)$ ,  $I_{EC}(q)$  und  $I_{Cd}(q)$  für die Streubeiträge von der Gesamtprobe (S=sample), der Leerküvette (EC=empty cell) und des Hallenuntergrunds (Cd=Cadmium),

mit  $T_s$ ,  $T_{EC}$  und  $T_{Cd}$  für die jeweiligen Transmissionen

und mit  $M_s$ ,  $M_{EC}$  und  $M_{Cd}$  für die jeweiligen Monitorwerte.

- flacher Untergrund

Die bisher ermittelten Daten geben die Streuung des gesamten Küvetteninhalts wieder. Der inkohärente Streuanteil darin bildet einen flachen Untergrund. Ein weiterer flacher Untergrund findet sich, wenn die in unserem Fall Strukturen in Lösung untersucht werden, durch die Streuung des Lösungsmittels (bei uns wäßrige Puffer). Der Beitrag des Puffers kann gemessen werden, indem man ihn in reiner Form in den Strahl stellt.

Ein flacher Untergrund kann aber unter bestimmten Voraussetzungen auch rein mathematisch ermittelt und abgezogen werden. Der überwiegende Teil der Streuung durch Form- und Strukturfaktor liegt bei sehr kleinen Winkeln, bei hohen q-Werten, deren Größenordnung von der Dimension der Probe abhängt, geht der Streubeitrag der Probe gegen Null. Hat man in einem ausreichenden q-Bereich gemessen, so ist der Untergrund gleich der Steigung bei hohen q-Werten in einer Auftragung von

$I(q)q^4$  gegen  $q^4$  (ein "Porod-Plot").

- Absolutauswertung

Nach Abzug der Pufferstreuung kann die Probe „absolut normiert“ werden, d.h. es kann der differentielle Streuquerschnitt der Probenmoleküle pro Einheitsvolumen errechnet werden.

Hierfür gilt:

$$\frac{d\sum_s}{d\Omega} = \frac{\frac{I_s(q)}{M_s} - \frac{T_s}{T_B} \frac{I_B(q)}{M_B} - (1 - \frac{T_s}{T_B}) \frac{I_{Cd}(q)}{M_{Cd}}}{\frac{I_w(q)}{M_w} - T_w \frac{I_{EC}(q)}{M_{EC}} - (1 - T_w) \frac{I_{Cd}(q)}{M_{Cd}}} \cdot \frac{(1 - T_w)}{4\pi D_s T_s f} \quad (4.20)$$

dabei stehen  $I_B(q)$ ,  $T_B$  und  $M_B$  für Streubeitrag, Transmission und Monitor des Puffers sowie  $D_s$  für die Küvettendicke.

$f = \frac{1}{g}$  ist eine Korrekturfaktor für die Anisotropie auf Grund des inelastischen inkohärenten Strukturfaktors und für die Wellenlängenempfindlichkeit des Detektors (May et al.). Einige Beispiele für Werte am SANS-Diffraktometer D11 am ILL finden sich in Jacrot et al..

Auf der Basis absolut normierter Daten kann das Molekulargewicht errechnet werden:

$$M = \frac{I_s^{coh}(0)}{I_w c D_s T_s} \frac{(1 - T_w) g}{4\pi N_A} \left( \sum b_i - \rho_b V \right)^2 \quad (4.21)$$

$c$  steht dabei für die Konzentration der Probenmoleküle und  $N_A$  für die Avogadrokonstante.

- Streumassenradius

Ermittelt man den Streumassenradius mit einem Guinier-Plot, steht eine große Auswahl von kommerziellen und privat geschriebenen Programmen zur Verfügung. Für eine Bestimmung aus der  $p(r)$ -Funktion müssen die Daten vorher Fourier-transformiert werden. Das für diese Arbeit verwendete Programm itp führt automatisch eine Berechnung des  $R_G$  durch. Die Berechnung mit dem Guinier-Plot ist einfacher und damit für eine schnelle, provisorische Auswertung und große Datenmengen geeignet. Geht man von der  $p(r)$ -Funktion aus geht dafür ein größerer Teil der Streukurve in das Ergebnis ein, Aggregate und Probleme mit dem Strukturfaktor spielen damit eine kleinere Rolle.

- nicht berücksichtigte, aber vorhandene Effekte: Winkelabhängigkeit der Transmission, Mehrfachstreuung

- verwendete Software

Für die am ILL gemessenen Daten wurden die folgenden von Roland May geschriebenen Auswertprogramme verwendet:

rnlp	zur Auflistung der gemessenen Spektren
rnlr4	zur radialen Mittelung der Daten mit gleichzeitiger Totzeitkorrektur
itrp	zur Errechnung der Transmissionen unter Berücksichtigung des Totzeiteffekts

spolh	zum Untergrundabzug und zur Teilung durch die Wasserkurve
addspc2	zur Vorbereitung von Eingabedateien für spolh
gui	für die Ermittlung von Streumassenradien nach Guinier und die Bestimmung des Untergrunds nach Porod

## 4.5. Indirekte Fouriertransformation

Wie in der Einleitung geschildert, ist eine direkte Fouriertransformation experimenteller Streukurven wegen der fehlenden Daten bei kleinen  $q$ -Werten, der Wellenlängenverschmierung und der geometrischen Verschmierung nicht durchführbar. Um die Daten dennoch in Form von Abstandsverteilungsfunktionen darstellen zu können wurden Methoden zur indirekten Fouriertransformation entwickelt (Glatter, 1977, Svergun, 1992).

In der vorliegenden Arbeit wurde dazu die Programme ITP und ITO von Otto Glatter in einer von Roland May an UNIX angepaßten Version verwendet.

Die Grundannahme dieser Methode ist, daß innerhalb der Probenmoleküle ein Maximalabstand  $D_{\max}$  zwischen zwei Volumenelementen vorkommt und die  $p(r)$ -Funktion nur für Werte  $0 < r < D_{\max}$  von 0 verschiedene Werte annehmen kann. Außerdem wird eine unendlich verdünnte Lösung der Probe angenommen.

Die  $p(r)$ -Funktion kann dann als Summe kubischer B-Splines, also von speziellen Polynomen dritter Ordnung dargestellt werden:

$$p(r) = \sum_{v=1}^N c_v \phi_v(r) \quad (4.22)$$

Die Entwicklungskoeffizienten  $c_v$  sind die zu bestimmenden Unbekannten, die gewünschte Zahl der B-Splines  $\phi_v$  muß im Programm definiert werden. Eine zu niedrige Zahl von B-Splines führt dabei zu einer schlechten Approximierung der Kurve, bei einer zu hohen Zahl gibt es zu viele Freiheitsgrade und die theoretische Kurve oszilliert um die experimentellen Daten.

Das Optimum der Kombination von Entwicklungsparametern ist das Minimum der „Standartabweichung pro Punkt“:

$$L = \sum_{i=1}^M \frac{[I_{\exp}(q_i) - \sum_{v=1}^N c_v \chi_v(q_i)]^2}{\sigma^2(q_i)} \quad (4.23)$$

$\chi_v$  steht für die um Verschmierungseffekte korrigierten B-Splines,  $M$  für die Anzahl der Meßpunkte und  $\sigma(q_i)$  für die Standardabweichung des  $i$ -tes Meßpunktes.

Da ein Teil der Schwankungen zwischen den Meßpunkten der Streukurve nicht von der Struktur der Probe, sondern von statistischen Fehlern bedingt ist, wird ein Stabilisierungsfaktor  $N_c$  eingeführt, der verhindert, daß sich die theoretische Kurve allen Meßfehlern anpaßt:

$$N_c = \sum_{v=1}^{N-1} (c_{v+1} - c_v)^2 \quad (4.24)$$

Beim Minimum dieser Funktion ist die Streukurve optimal geglättet.

Als Kompromiß zwischen einer möglichst detailgetreuen und einer möglichst gut geglätteten Kurve wird bei Glatter das Minimum der Beziehung  
 $(L + \lambda N_c)$

vorgeschlagen.

$\lambda$  steht für den Lagrange-Multiplier, der beschreibt, wie stark der Beitrag des Stabilisierungsfaktors ist.

Auf der Basis der von ITP berechneten  $p(r)$ -Funktion kann ein Streumassenradius ermittelt werden, der weniger stark als beim Guinier-Plot von sehr kleinen  $q$ -Werten abhängt.

Für Moleküle mit endlicher Größe gilt  $p(0)=0$ . Damit erlaubt die gewonnene  $p(r)$ -Funktion die Kontrolle des Untergrundabzugs: weicht  $p(0)$  von 0 ab, so muß dieser korrigiert werden.

Bei Aggregationseffekten in einer Probe steigt die Streukurve gegen niedrige  $q$ -Werte steil an. In solchen Fällen muß von Fall zu Fall entschieden werden, ob eine indirekte Fouriertransformation noch sinnvoll ist. Handelt es sich um eine geringe Menge von Aggregaten, die wesentlich größer als die Probenmoleküle sind, kann dieses Problem unter Umständen gelöst werden, indem die Punkte mit den niedrigsten  $q$ -Werten nicht für die indirekte Fouriertransformation herangezogen werden. Es muß dann bei der Interpretation der  $p(r)$ -Funktionen beachtet werden, daß diese nicht mehr viel experimentelle Information über die großen Abstände enthalten.

Für den Football-Komplex aus GroEL und GP31 (Kapitel 2.1.4) wurden leichte Aggregationseffekte beobachtet (Abb. 2.15). Es konnte in der Datenauswertung gezeigt werden, daß diese die Fläche des zweiten Peaks in der  $p(r)$ -Funktion beeinflussen, nicht aber seine Position.

## 4.6. Modellierung von Streukurven und Abstandsverteilungsfunktionen

Eine Streukurve enthält nicht genügend Information, um eindeutig die Struktur der Probenmoleküle zu bestimmen. Umgekehrt kann aber eine exakte theoretische Streukurve einer bekannten Struktur in homodisperser Lösung berechnet werden. Dazu wurde für die vorliegende Arbeit das Programm MULTIBODY von Otto Glatter in einer von Roland May leicht modifizierten Version verwendet (Glatter, 1980).

Die Strukturmodelle werden hierbei aus Kugeln mit gleich großem Radius zusammengesetzt, die Dichten dieser Kugeln können bei Bedarf modifiziert werden. Die Streukurve eines solchen Aggregates aus  $n$  Kugeln kann dann nach der Debye-Formel berechnet werden:

$$I(q) = \sum_{i=1}^n g_i^2 \phi_i^2(q) + 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{k=i+1}^n g_i g_k \phi_i(q) \phi_k(q) \frac{\sin d_{ik} q}{d_{ik} q} \quad (4.25)$$

Hierbei steht  $g_i$  für den Gewichtungsfaktor der  $i$ -ten Kugel,  $\phi_i$  für den Formfaktor der  $i$ -ten Kugel und  $d_{ik}$  für den Abstand zwischen  $i$ -ter und  $k$ -ter Kugel. Für den Gewichtungsfaktor gilt:

$$g_i = \rho_i V_i = \rho_i \frac{4\pi}{3} R_i^3 \quad (4.26)$$

dabei steht  $\rho_i$  für die Streulängendichte der i-ten Kugel mit dem Volumen  $V_i$  und dem Radius  $R_i$ . Der Formfaktor der Kugeln lässt sich berechnen durch die Formel

$$\phi_i(q) = 3 \frac{\sin(R_i q) - (R_i q) \cos(R_i q)}{(R_i q)^3} . \quad (4.27)$$

Aus Gründen der einfacheren Programmierung wird in MULTIBODY die Abstandsverteilungsfunktion nicht über eine direkte Fouriertransformation der Streukurve durchgeführt, sondern über eine zu 4.5 analoge Formel.

In einem realen SANS-Experiment wird eine Streukurve durch drei Effekte verschmiert: durch die endliche Breite der Wellenlängenverteilung nach dem Selektor tritt eine Verschmierung auf, die endliche Strahlgröße führt zu einer geometrischen Verschmierung, ein weiterer geometrischer Effekt tritt durch die endliche Größe der Detektorzellen auf. Der letzte Effekt kann in erster Näherung vernachlässigt werden, da bei unseren experimentellen Bedingungen der Strahl größer als mehrere Detektorzellen ist. Die beiden anderen Effekte müssen beim Vergleich von Modellkurven mit experimentellen Daten berücksichtigt werden. Deshalb wurden die von MULTIBODY erzeugten theoretischen Streukurven mit einem Programm von Isabelle Grillo, das Wellenlängeneffekt und Strahlgröße berücksichtigt, theoretisch verschmiert.

Die meisten Modelle dieser Arbeit wurden auf der Basis von Röntgenkristallstrukturen erstellt. Da die atomare Auflösung dieser Daten weit unter der Auflösung der Kleinwinkelstreuung liegt, wurden nur die C- $\alpha$ -Koordinaten berücksichtigt. In der Kristallographie nicht aufgelöste Aminosäuren wurden in den Modellen ergänzt, im Fall von GroEL und Thermosom in Form eines Zylinders in Zentrum des Oligomers (Stegmann et al.) . Diese wurden als Mittelpunkte von Kugeln mit dem Radius 3,238Å definiert. Soweit nicht anderes angegeben, wurde die Streulängendichte innerhalb einer Untereinheit als homogen angenommen.

Mögliche Effekte von Hydratationsschichten (Svergun et al., 1998) um das Protein wurden nicht in unsere Modelle aufgenommen. Kontrastvariationsversuche ließen solche Effekte zumindest für den Fall von GroEL auch als unwahrscheinlich erscheinen (Daten nicht gezeigt).

## 4.7. Proteinreinigung und Puffer

Die Proteinreinigung von GroEL, GroES und MBP (Y283D) wurde von Frau Dr. Elena N. Manakova nach in der Literatur beschriebenen Methoden durchgeführt (Landry, Zahn, Manakova). GP 31 wurde von Prof. Dr. Saskia van der Vies zur Verfügung gestellt. Citrat-Synthase, (G276A) wurde von Herrn Dr. Peter Lindner, Universität Zürich, zur Verfügung gestellt. Einige – nicht besonders erfolgreiche - Tests wurden mit kommerziell erhältlichen Substratprotein durchgeführt.

### Expression und Reinigung von GroEL mit ersten Reinigungsschritten von GroES

Wild type GroEL und GroES wurden in verschiedenen E. coli Stämmen (W3110, JM 109, MRE 600) mit dem Plasmid pOF39 exprimiert. Protonierte Zellen wurden in LB-Medium gezogen, deuterierte in den Minimalmedien M9 oder M63 mit D-Glucose oder D-Succinat als Kohlenstoffquelle, für das teildeuterierte Protein wurde H-Glucose als Kohlenstoffquelle verwendet. Für die Zucht der teildeuterierten Zellen wurde ein Fermenter verwendet, um möglichst stabile Wachstumsbedingungen zu gewährleisten. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt und bei -80°C eingefroren.

Zur Reinigung wurden die Zellen in einem Spaltungspuffer (100 mM Tris-HCl pH8.1, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 3 mg/ml Lysozym, 0.2 mg/ml PMFS) aufgetaut und in einer French Pressure Cell Press (American Instrument Company, USA) aufgeschlossen. Zellreste wurden durch Zentrifugation (30000g, 1 Stunde bei 4°C) abgetrennt. Das Lysat wurde anschließend mit einer DE52-Servacel („Serva“) Säule gereinigt (Puffer: 30 mM Tris-HCl, pH 7.8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM DTT). GroEL und GroES wurden getrennt bei 320 bzw. 240 mM eines NaCl-Gradienten (0-500 mM) eluiert. Zur Verringerung der Salzkonzentration und zur Einstellung des pH für die folgende Chromatographie wurden die GroEL-Fraktionen in einem His-HCl-Puffer, pH 5.8-5.6 fünf bis sechsmal verdünnt.

Der nächste Reinigungsschritt wurde auf derselben DE52-Servacel-Säule, diesmal mit 25 mM Histidin-HCl, pH 5.7, 1 mM DTT equilibriert, durchgeführt. GroEL wurde bei einer NaCl-Konzentration von 300-400mM NaCl innerhalb eines Gradienten von 0-500 mM NaCl eluiert, GroES erscheint bei diesen Bedingungen bei 200-300 mM NaCl. Zu den gepoolten GroEL Fraktionen wurde 0.4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gegeben, anschließend wurden sie mit einer Buthyl-Sepharose-Säule (Pharmazia, equilibriert mit 20mM k-MOPS, pH 7.2, 1mM DTT, 0.4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  weiter gereinigt. GroEL wurde in einem Gradienten von 0.4 M bis 0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  weiter eluiert. Dieser Schritt erlaubt, letzte Reste von GroES zu entfernen, da es normalerweise nicht an die Säule bindet.

Nach diesen Schritt wurde das Protein aufkonzentriert und zuletzt auf eine Sephacryl S-300-Säule (Pharmacia, equilibriert mit dem Lagerungspuffer, 30mM Tris-Hcl, pH7.8, 150 mM NaCl, 1mM Dtt, 0.1 mM EDTA, 0.02%  $\text{NaN}_3$  10% glycerol) aufgetragen. Die gepoolten GroEL Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Da GroEL und GroES kein Tryptophan enthalten, kann das Fluoreszenzspektrum als Maßstab der Reinheit verwendet werden. Nach einem letzten Reinigungsschritt kann in der Probe kein Tryptophan mehr nachgewiesen werden. Hierzu werden die letzten



Kontaminationen durch eine Säule mit „reactive red agarose“ (Sigma, tupe 120) beseitigt. Auf 100 ml Proteinlösung einer Konzentration von 0.1-0.5 mg/ml wurden 10 ml Harz gegeben; diese Lösung wurde über Nacht bei 4°C durchgerührt. Das Harz wurde anschließend durch Zentrifugation entfernt und die Proteinlösung nochmals aufkonzentriert.

### Reinigung von GroES

Wie bei Corrales et al. beschrieben, wurden die GroES-Fraktionen zunächst während 20 bis 30 min bei 56°C inkubiert. Die Präzipitationen wurden durch Zentrifugation entfernt (30000g, 1 Stunde bei 4°C). Die GroES-Lösung wurde nach einer Aufkonzentrierung mit 0.8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  auf eine Phenyl-Sepharose-Säule (equilibriert mit 20 mM K-MOPS, pH 7.2, 0.8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 mM DTT, 0.02  $\text{NaN}_3$ ) aufgetragen und in einem umgekehrten  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradienten (0.8 M-0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) eluiert. Als letzter, fakultativer Schritt wurde GroES auf eine Sephacryl S-300-Säule geladen und mit dem Lagerpuffer (30 mM Tris-HCl, pH 7.8, 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.02%  $\text{NaN}_3$ ) eluiert und nach einer letzten Aufkonzentrierung bei -80°C eingefroren.

### Reinigung der GroES single-Ring (SR1) Mutante

Die SR1-Mutante von GroEL (R452E, E461A, S463A, V464A) (Nielsen et al.) wurde aus dem überexprimierenden Stamm BL21 mit dem Plasmid pET11a DE3 SR1-GroEL gereinigt. Der Stamm wurde freundlicherweise von Prof. Dr. F.-U. Hartl, MPI für Biochemie zur Verfügung gestellt. Die Reinigungsprozedur ist zunächst mit der identisch mit dem Protokoll für wild type GroEL. Da dieses Verfahren jedoch wild type GroEL nicht von SR1 GroEL trennt, wird eine Gleichgewichtszentrifugation (26 Stunden bei 25000 rpm) in einem Glyceringradienten von 10-35% (in 20 mM Tris HCl, pH 7.8, 150 mM NaCl, 1 mM DTT) hinzugefügt.

### Expression und Reinigung von MBP Y283D

MPBm wurde aus dem *E. coli*-Stamm Y283D mit dem Plasmid pHD 1204 Y283D überexprimiert, der freundlicherweise von Prof J. Buchner, Universität Regensburg zur Verfügung gestellt wurde. Zur Reinigung wurde das bei Sparrer et al. (1996) beschriebene Protokoll verwendet.

### Bildung von GroEL-MBPm-Komplexen

Zur Bildung von Komplexen aus GroEL und MBPm wurde hochkonzentriertes Substratprotein zunächst zwei Stunden lang bei Raumtemperatur in einem Puffer mit 8 M Harnstoff, 20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 50 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  denaturiert. Anschließend wurde das MBP mit einem hohen Verdünnungsfaktor (100-200) zur GroEL-Lösung gegeben. Einige Male wurden die Komplexe dann mit einer Gelfiltration

von Aggregaten gereinigt, in diesem Fall können allerdings keine 1:2-GroEL-MBP-Komplexe mehr gefunden werden.

#### kommerzielles Substratprotein

Für die Versuche an kommerziellem Substratprotein wurden wt-LDH (Laktat-Dehydrogenase), wt-MDH (Malat-Dehydrogenase) und wt-MBP von Boehringer Mannheim verwendet. Alle drei Proteine stammen aus dem Schweineherz.

#### Puffer für SANS-Messungen an GroE

Der Puffer für die SANS-Messungen an GroE enthielt 20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 50mM KCl und 10mM  $MgCl_2$ .

Die Messungen zum Football-Komplex und die chasing Experimente wurden bei einer Konzentration von 10mg/ml durchgeführt, die anderen Messungen bei Konzentrationen zwischen 2 und 5 mg/ml.

AMP-PNP wurde in einer Konzentration von 30 mM zu den Proben gegeben, für ADP und ATP wurden jeweils Konzentrationen von 2-3 mM gewählt.

Die Temperatur während der Messung betrug, wenn nicht anders angegeben, 20°C, die Messungen am Football-Komplex wurden bei 10°C durchgeführt.

Die Deuterierung des Puffers kann jeweils dem Ergebnisteil entnommen werden.

#### Expression, Reinigung und Puffer von Thermosom

Thermosom wurde von Frau Dr. Irina Gutsche und Frau Nadine Rauh nach in der Literatur beschriebenen Methoden (Ditzel et al.) gereinigt.

Der Standardpuffer („physiologische Puffer“) für Thermosom bestand aus 20 mM Tris-HCl pH 7.0, 50 mM NaCl, 10mM  $MgCl_2$ , 1mM EDTA, 1mM DTT, 2mM  $NaN_3$  und 5% Glycerin. Es wurde bei Proteinkonzentrationen von 2-5 mg/ml gemessen. Bei Versuchen mit Nukleotiden wurden jeweils Konzentrationen von 20 mM ADP, 20mM ATP oder 200 mM AMP-PMP verwendet, um eine Sättigung des Proteins sicherzustellen.

Bis auf die Versuche mit dem Kristallisationspuffer wurde immer mit Puffern auf  $D_2O$ -Basis gearbeitet.

Die Basis des Kristallisationspuffers ist ein 100mM NaAc/HAc-Puffer mit pH 5.6, hierzu wurde unmittelbar vor der Messung 2M  $(NH_4)_2SO_4$  gegeben. Für die Messung der Konformation des Proteins war ein  $H_2O$ -Puffer erforderlich, um Aggregationen zu vermeiden. Als Kontrolle wurden auch Messungen mit 1M  $(NH_4)_2SO_4$  und 1M  $Na_2SO_4$  durchgeführt.

## 5. Zusammenfassung

### Problemstellung

Proteinfehlfaltungen und –aggregationen werden in der Zelle durch eine Reihe von Enzymklassen, die sogenannten Chaperone, verhindert oder rückgängig gemacht. Zu den Chaperonen gehört die Gruppe der Chaperonine oder Hsp60-Proteine.

GroEL aus *E. coli*, der am meisten untersuchte Vertreter der Chaperonine, hat eine Struktur aus zwei Ringen (Abb. 5.1 a) mit jeweils einem offenen Hohlraum zur vorübergehenden Bindung von denaturiertem Protein (Substratprotein) (Abb. 5.1 d). Das Co-Chaperonin GroES kann durch die Bindung an GroEL den Hohlraum schließen (Abb. 5.1b, 5.1c). Diese Arbeit trägt zur Charakterisierung des Zusammenspiels zwischen GroEL, Substratprotein, GroES und dem GroES-Analogon GP31 des Phagen T4 bei. Zu einem besseren Verständnis des GroEL-Reaktionszyklus wurden Abstände zwischen Bestandteilen der Komplexe bestimmt, Konformationsänderungen von GroES und GP31 bei der Bindung an GroEL untersucht und Bindungskonstanten sowie Dissoziationsraten gemessen.

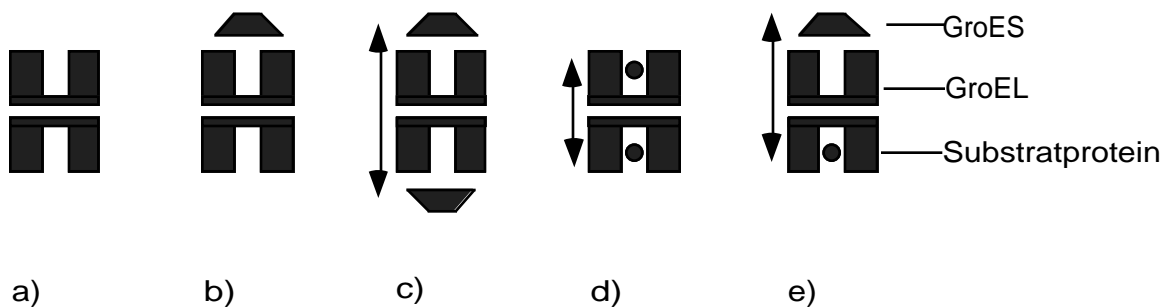


Abbildung 5.1:

schematische Darstellung von GroEL allein und im Komplex mit GroES und/oder Substratprotein

a) GroEL allein, b) GroEL-GroES „Bullet-Komplex“, c) GroEL-GroES-Football-Komplex, d) Komplex mit zwei gebundenen Substratproteinen e) „trans-Komplex“ mit gleichzeitiger Bindung von GroES und Substratprotein

Die Pfeile entsprechen im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Abständen.

Das Thermosom, das Chaperonin aus *Thermoplasma acidophilum*, hat wie GroEL eine Struktur aus zwei Ringen mit jeweils einem Hohlraum. Dieser wird jedoch nicht wie bei GroEL durch ein Co-Chaperonin geschlossen, sondern durch starke Verschiebungen der apikalen Domänen des Proteins selbst. Dadurch können sich eine an beiden Seiten geschlossene Konformation oder eine an einer Seite geschlossene Bullet-Konformation ergeben (Abb. 5.2). Zum Verständnis des Thermosom-Reaktionszyklus untersuchten wir, welche Parameter die Öffnung oder Schließung des Proteins induzieren können.

Die Untersuchungen wurden mit Hilfe der Neutronenkleinwinkelstreuung (SANS) durchgeführt. Diese Technik erlaubt es, Strukturinformation mit niedriger Auflösung von Proteinen und Proteinkomplexen im Lösung zu gewinnen. Bei den Versuchen an GroEL wurde mit Kontrastausgleichsexperimenten gearbeitet, die bestimmte Elemente der Komplexe durch spezifische Isotopenmarkierungen besonders hervorheben.

Am Thermosom wurden bisher noch keine Komplexe untersucht. Hier war von großem Vorteil, daß bei SANS kein Strahlenschaden auftritt und damit Proben modifiziert und anschließend noch einmal gemessen werden konnten.

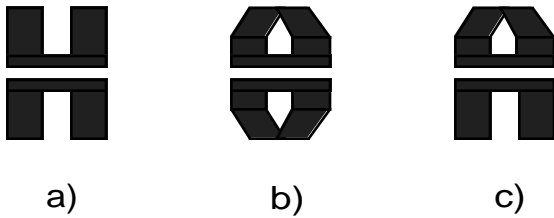


Abbildung 5.2:  
schematische Darstellung verschiedener Thermosom-Konformationen:  
a) offenen Konformation, b) geschlossene Konformation c) Bullet-Konformation

## Ergebnisse

### *Ergebnisse zu GroE*

- Zum Verständnis der allosterischen Wechselwirkungen innerhalb von GroEL wurde die Lösungsstruktur einer „single-ring“-Mutante von GroEL untersucht. Die Strukturen von apo-single-ring-GroEL und ADP-Komplexen aus protoniertem single-ring-GroEL und protoniertem GroES unterscheiden sich nicht oder nicht meßbar von den entsprechenden Strukturen im Kristall. Bei einer Messung mit ADP-Komplexen aus unsichtbarem single-ring-GroEL und sichtbarem GroES wurde dagegen in der Lösungsstruktur eine im Kristall nicht vorhandene Konformationsänderung von GroES beobachtet. Dies bestätigt frühere mit wild-type GroEL durchgeführte Versuche.
- Symmetrische Komplexe aus GroEL und GroES, sogenannte Football-Komplexe, werden als wichtiger Zwischenschritt im GroE-Reaktionszyklus diskutiert. In Anwesenheit von AMP-PNP konnten Football-Komplexe aus protoniertem, gematchtem GroEL und deuteriertem GroES nachgewiesen werden. In der Neutronenstreuung zeigen diese Komplexe eine charakteristische Hantelstruktur. Die beiden GroES-Moleküle haben einen Abstand von ca. 200Å (siehe Pfeil in Abb. 5.1c). Mit einer Titrationsreihe konnten wir die Dissoziationskonstante des zweiten GroES-Heptamers in diesen Komplexen mit einem Wert von  $2 \cdot 10^{-7} \text{M}$  bestimmen.
- Der Phage T4 hat ein Gen für ein eigenes Co-Chaperonin, GP31, das eine starke Analogie zu GroES aufweist. Wir verglichen die beiden Co-Chaperonine, um zu verstehen, warum GP31 lebenswichtig für den Phagen ist. Aus GroEL und GP31 wurden dazu in Anwesenheit von AMP-PNP Football-Komplexe gebildet. Bei diesen Komplexen ist das Co-Chaperonin etwa 5Å weiter vom Zentrum des Gesamtkomplexes entfernt, als im Fall der GroEL-GroES-Komplexe. Dieses Ergebnis unterstützt die These, GP31 sei nötig, um für die Faltung des Phagenproteins GP23 einen größeren Anfinsen-Cage zu schaffen. GP31 scheint unter vergleichbaren Bedingungen stärker zur Bildung von Football-Komplexen zu neigen als GroES. Bei der Bindung an GroEL ändern GP31 und GroES ihre Konformation.

- In Verdrängungsversuchen wurde das Bindungsverhalten von GroES und GP31 an GroEL untersucht. Hierzu wurden mit Hilfe von ADP-Komplexen aus sichtbarem GroEL mit sichtbarem Co-Chaperonin vorgeformt. Das sichtbare Co-Chaperonin wurde dann mit unsichtbarem GroES verdrängt, so daß in den neugebildeten Komplexen nur noch GroEL ein Streusignal gab. Die beobachteten Zerfallsreaktionen mit Halbwertszeiten in der Größenordnung von Stunden lassen sich mit zwei Exponentialfunktionen beschreiben. Dies ist ein Indiz für das Auftreten von verschiedenen Populationen an GroEL-Co-Chaperonin-Komplexen. In allen Fällen waren die Dissoziationsraten bei den GroEL-GP31-Komplexen geringer als bei GroEL-GroES-Komplexen. Komplexe von GroEL mit GP31 sind also stabiler als solche mit GroES.
- Bei einer Reihe von Versuchen mit GroEL und Substratprotein (MPB-Y283D) konnten unter anderem 1:2 Komplexe aus GroEL und Substrat und Trans-Komplexe aus GroEL, GroES und Substrat nachgewiesen werden. Diese Experimente zeigten übereinstimmend einen Abstand von 60Å des MPB zum Zentrum von GroEL. Wegen der notwendigen Denaturierung von MBP und anderen Substratproteinen wurden jedoch die Streukurven sehr häufig von Aggregaten gestört. SANS-Experimente mit Substratprotein sind daher wesentlich schwieriger als Versuche mit GroES oder GP31.

#### *Ergebnisse zum Thermosom*

- Die geschlossene Konformation von Thermosom in der Kristallstruktur rührt nicht von der Bindung von Mg-ADP-AIF<sub>3</sub> her, sondern vom für die Kristallisation verwendeten Ammoniumsulfat. In Anwesenheit von ADP mit 2M Phosphat, schließt sich das Thermosom auch in physiologischem Puffer. Durch die hohe Phosphat-Konzentration ist davon auszugehen, daß sich in den Nukleotidbindungstaschen des Proteins neben ADP freie Phosphat-Ionen befinden. Die Konformation entspricht also dem Zustand unmittelbar nach der ATP-Spaltung. Wird die Probe auf 50°, die physiologische Temperatur von *T. acidophilum*, erwärmt, schließt sich das Thermosom in Anwesenheit von ATP. In Kombination mit den Messungen an anderen Thermosom-Nukleotid-Komplexen konnten damit Zwischenzustände im strukturellen Reaktionszyklus des Chaperonins charakterisiert werden.
- Bei einer Reihe von Pufferbedingungen wurde die Bildung von Komplexen höherer Ordnung beobachtet. Von anderen Autoren war aufgrund von EM-Arbeiten vorgeschlagen worden, daß Thermosom kein Chaperonin, sondern ein Baustein des Cytoskeletts ist (Trent et al., 1997, 1998). Für die von uns gefundenen Strukturen sind Thermosom-Filamente jedoch keine befriedigenden Modelle. Da sich diese Komplexe höherer Ordnung in der Lösung außerdem bei einer Annäherung an physiologische Bedingungen auflösen, kann davon ausgegangen werden, daß sie *in vivo* nicht relevant sind.

### *methodische Ergebnisse*

- Es wurde gezeigt, daß GroEL und GroES einen sehr homogenen Deuterierungsgrad haben, wenn die Bakterien vor der Reinigung unter gut kontrollierten Wachstumsbedingungen im Fermenter gezogen werden. Das Protein erscheint dann in Kontrastausgleichsexperimenten im geeigneten Puffer, in unserem Fall nahe 99% D<sub>2</sub>O, als unsichtbar.
- In einer Reihe von „stopped-flow“-Messungen wurde gezeigt, daß mit SANS (bei einer Aufsummierung von Daten mehrerer Messungen) grundsätzlich eine Zeitauflösung bis in den Sekundenbereich bei Experimenten an GroEL oder vergleichbar großen Molekülen möglich ist. Um biologisch relevante Ergebnisse erreichen zu können, ist jedoch weitere Arbeit an der Instrumentierung, speziell der Mischapparatur nötig.

## 6. Literatur

Anfinsen CB. (1973) "Principles that govern the folding of protein chains" *Science*. 181(96):223-30

Ang D, Keppel F, Klein G, Richardson A, Georgopoulos C. (2000) "Genetic analysis of bacteriophage-encoded cochaperonins" *Annu Rev Genet.* ;34:439-456

Behlke J, Ristau O, Schönfeld HJ. (1997) "Nucleotide-dependent complex formation between the *Escherichia coli* chaperonins GroEL and GroES studied under equilibrium conditions" *Biochemistry*. 36(17):5149-56

Beissinger M, Rutkat K, Buchner J. (1999) "Catalysis, commitment and encapsulation during GroE-mediated folding" *J Mol Biol*. 289(4):1075-92.

Braig K, Otwinowski Z, Hegde R, Boisvert DC, Joachimiak A, Horwich AL, Sigler PB. (1994) "The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å." *Nature*. 371(6498):578-86.

Burston SG, Ranson NA, Clarke AR. (1995) "The origins and consequences of asymmetry in the chaperonin reaction cycle" *J Mol Biol*. May 26;249(1):138-52.

Büttner, H. G., Lelièvre-Berna, E. & Pinet, F. (1997) *The yellow book. Guide to neutron research facilities at the ILL. Institut Laue-Langevin*, 32-33

Carlile C (1998) "Lectures on neutron scattering techniques" Summer School on neutron scattering at Palau/Corsica, 27/9-3/10/1998

Carrascosa JL, Llorca O, Valpuesta JM. (2001) "Structural comparison of prokaryotic and eukaryotic chaperonins" *Micron*. Jan;32(1):43-50. Review.

Cliff MJ, Kad NM, Hay N, Lund PA, Webb MR, Burston SG, Clarke AR (1999) "A kinetic analysis of the nucleotide-induced allosteric transitions of GroEL" *J Mol Biol*. Oct 29;293(3):667-84.

Corrales FJ, Fersht AR. (1996) "Kinetic significance of GroEL<sub>14</sub>.(GroES<sub>7</sub>)<sub>2</sub> complexes in molecular chaperone activity. " *Fold Des.*;1(4):265-73.

Debye (1915) "Scattering of non-crystalline substances" *Ann. Phys.* 46, 809-823

Dinner AR, Sali A, Smith LJ, Dobson CM, Karplus M. (2000) "Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment." *Trends Biochem Sci*. (7):331-9

Ditzel L, Lowe J, Stock D, Stetter KO, Huber H, Huber R, Steinbacher S. (1998) "Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT", *Cell*, 93(1):125-38.

Dunn AY, Melville MW, Frydman J. (2001) "Review: cellular substrates of the eukaryotic chaperonin tric/cct. " *J Struct Biol*. Aug;135(2):176-84.

Ellis RJ. (1994) "Molecular chaperones. Opening and closing the Anfinsen cage" *Curr Biol*. Jul 1;4(7):633-5.

Engel A, Hayer-Hartl MK, Goldie KN, Pfeifer G, Hegerl R, Muller S, da Silva AC, Baumeister W, Hartl FU (1995) "Functional significance of symmetrical versus asymmetrical GroEL-GroES chaperonin complexes" *Science*. 269(5225):832-6

Feng H, Zeng Y, Whitesell L, Katsanis E. (2001) "Stressed apoptotic tumor cells express heat shock proteins and elicit tumor-specific immunity. " *Blood*. Jun 1;97(11):3505-12.

Gast K, Damaschun H, Eckert K, Schulze-Forster K, Maurer HR, Muller-Frohne M, Zirwer D, Czarnecki J, Damaschun G. (1995) "Prothymosin alpha: a biologically active protein with random coil conformation" *Biochemistry*. 34(40):13211-8.

Ghosh RE, Egelhaaf SU, Rennie AR (1998) "A Computing Guide for Small-Angle Scattering Experiments" ILL technical report ILL98GH14T

Glatter, O. (1977) "A new method for the evaluation of small-angle scattering", *Journal of Appl. Crystall*. 10, 415-421

Glatter, O. (1980) "Computation of Distance Distribution Functions and Scattering Functions of Models for Small Angle Scattering Experiments" *Acta Physica Austriaca*, 52, 243-256

Glatter, O. (1982) chapter 4 in "Small Angle X-Ray Scattering" Academic Press London, edited by O. Glatter and O. Kratky

Gorovits BM, Ybarra J, Seale JW, Horowitz PM. (1997) "Conditions for nucleotide-dependent GroES-GroEL interactions. GroEL14(GroES7)<sub>2</sub> is favored by an asymmetric distribution of nucleotides" *J Biol Chem*. Oct 24;272(43):26999-7004.

Gottesman ME, Hendrickson WA. (2000) "Protein folding and unfolding by Escherichia coli chaperones and chaperonins" *Curr Opin Microbiol* (2):197-202.

Grallert H, Buchner J. (2001) "Review: a structural view of the groe chaperone cycle. " *J Struct Biol*. Aug;135(2):95-103.

Gupta RS. (1995) "Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells." *Mol Microbiol*. Jan;15(1):1-11.



Gutsche I, Essen LO, Baumeister W. (1999) "Group II chaperonins: new TRiC(k)s and turns of a protein folding machine" *J Mol Biol.* 293(2):295-312

Gutsche I, Holzinger J, Rauh N, Baumeister W, May RP. (2001) "Atp-induced structural change of the thermosome is temperature-dependent. " *J Struct Biol.* Aug;135(2):139-46.

Gutsche, I, Holzinger, J, Röble, M, Heumann, H, Baumeister, W, and May, R.P. (2000) "Conformational rearrangements of an archeal chaperonin upon ATPase cycling", *Current Biol*, 10, 405-408

Gutsche I, Mihalache O, Hegerl R, Typke D, Baumeister W. (2000) "ATPase cycle controls the conformation of an archaeal chaperonin as visualized by cryo-electron microscopy" *FEBS Lett.* Jul 21;477(3):278-82.

Gutsche I, Mihalache O, Baumeister W. (2000) "ATPase cycle of an archaeal chaperonin" *J Mol Biol.*300(1):187-96

Hamouda, B (1995) "A Tutorial on Small Angle Neutron Scattering from Polymers", NIST, Gaithersburg, [http://webster.ncnr.nist.gov/programs/sans/polymer\\_tut.pdf](http://webster.ncnr.nist.gov/programs/sans/polymer_tut.pdf)

Harris JR, Pluckthun A, Zahn R. (1994) "Transmission electron microscopy of GroEL, GroES, and the symmetrical GroEL/ES complex" *J Struct Biol.* May-Jun;112(3):216-30.

Harrison CJ. (1997) "La cage aux fold: asymmetry in the crystal structure of GroEL-GroES-(ADP)<sub>7</sub>" *Structure.* Oct 15;5(10):1261-4

Hayer-Hartl MK, Ewalt KL, Hartl FU. (1999) "On the role of symmetrical and asymmetrical chaperonin complexes in assisted protein folding" *Biol Chem.* May;380(5):531-40

Hayer-Hartl MK, Martin J, Hartl FU (1995) "Asymmetrical interaction of GroEL and GroES in the ATPase cycle of assisted protein folding" *Science.* 269(5225):836-41

Hayer-Hartl MK, Weber F, Hartl FU (1996) "Mechanism of chaperonin action: GroES binding and release can drive GroEL-mediated protein folding in the absence of ATP hydrolysis" *EMBO J.*, 15(22):6111-21.

Holzinger, J, Heumann, H, Manakova, E, Röble, M, Vanatalu, K, Wiedenmann, A, and May, R.P. (2000) "GroEL single-ring solution structure obtained by small-angle neutron scattering", *Physica B* 276-278, 528-529

Horovitz A, Fridmann Y, Kafri G, Yifrach O. (2001) Review: allostery in chaperonins. *J Struct Biol.* Aug;135(2):104-14.

Horwich AL, Saibil HR. (1998) "The thermosome: chaperonin with a built-in lid" *Nat Struct Biol.* (5):333-6

Hunt JF, Weaver AJ, Landry SJ, Gierasch L, Deisenhofer J. (1996) "The crystal structure of the GroES co-chaperonin at 2.8 Å resolution.", *Nature.* (1996) 379(6560):37-45.

Hunt JF, van der Vies SM, Henry L, Deisenhofer J. (1997) "Structural adaptations in the specialized bacteriophage T4 co-chaperonin Gp31 expand the size of the Anfinsen cage", *Cell.*;90(2):361-71.

Inobe T, Makio T, Takasu-Ishikawa E, Terada TP, Kuwajima K. (2001) "Nucleotide binding to the chaperonin GroEL: non-cooperative binding of ATP analogs and ADP, and cooperative effect of ATP" *Biochim Biophys Acta.* Feb 9;1545(1-2):160-73.

Jackson GS, Clarke AR. (2000) "Mammalian prion proteins." *Curr Opin Struct Biol.* Feb;10(1):69-74.

Jacrot B. (1976) "The study of biological structure by neutron scattering in solution" *Rep.Prog.Phys.* 39, 911-953

Jacrot B., Zaccai G. (1981) "Determination of molecular weight by neutron scattering" *Biopolymers*, 20, 2413-2426,

Katz JJ, Crespi HL (1970) in "Isotope Effects in Chemical Reactions", Van Nostrand Reinhold: New York, edited by Collins CJ, Bowman, NS

Kushner DJ, Baker A, Dunstall TG. (1999) "Pharmacological uses and perspectives of heavy water and denatured compounds." *Can J Physiol Pharmacol.* Feb;77(2):79-88.

Landry SJ, Taher A, Georgopoulos C, van der Vies SM. (1996) "Interplay of structure and disorder in cochaperonin mobile loops. " *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 15;93(21):11622-7.

Lederer H, May RP, Kjems JK, Schaefer W, Crespi HL, Heumann H. (1986) "Deuterium incorporation into *Escherichia coli* proteins. A neutron-scattering study of DNA-dependent RNA polymerase" *Eur J Biochem.* 156(3):655-9.

Leroux MR, Hartl FU. (2000) "Protein folding: versatility of the cytosolic chaperonin TRiC/CCT" *Curr Biol.* 10(7):R260-4

Llorca O, Marco S, Carrascosa JL, Valpuesta JM. (1994) "The formation of symmetrical GroEL-GroES complexes in the presence of ATP" *FEBS Lett.* 345(2-3):181-6

Llorca O, Perez-Perez J, Carrascosa JL, Galan A, Muga A, Valpuesta JM. (1997) "Effects of the inter-ring communication in GroEL structural and functional asymmetry" *J Biol Chem.* 272(52):32925-32.

- Llorca O, Smyth MG, Marco S, Carrascosa JL, Willison KR, Valpuesta JM. (1998) "ATP binding induces large conformational changes in the apical and equatorial domains of the eukaryotic chaperonin containing TCP-1 complex" *J Biol Chem.* Apr 24;273(17):10091-4.
- Ma J, Sigler PB, Xu Z, Karplus M. (2000) "A dynamic model for the allosteric mechanism of GroEL" *J Mol Biol.* Sep 15;302(2):303-13.
- Manakova E (2001) "Study of structure and function of GroELS chaperonin system using small angle scattering", Dissertation, TU München
- Marusich EI, Kurochkina LP, Mesyanzhinov VV. (1998) "Chaperones in bacteriophage T4 assembly" *Biochemistry (Mosc).* Apr;63(4):399-406.
- May, RP, Ibel, K, and Haas, J (1982) "The Forward Scattering of Cold Neutrons by Mixtures of Light and Heavy Water", *J. Appl. Cryst.*, 15,15-19.
- Nielsen KL, Cowan NJ. (1998) "A single ring is sufficient for productive chaperonin-mediated folding in vivo." *Mol Cell.* Jul;2(1):93-9.
- Nitsch M, Walz J, Typke D, Klumpp M, Essen LO, Baumeister W. (1998) "Group II chaperonin in an open conformation examined by electron tomography" *Nat Struct Biol.* 5(10):855-7
- Phipps BM, Hoffmann A, Stetter KO, Baumeister W. (1991) "A novel ATPase complex selectively accumulated upon heat shock is a major cellular component of thermophilic archaeobacteria", *EMBO J.* Jul;10(7):1711-22.
- Ranson NA, Farr GW, Roseman AM, Gowen B, Fenton WA, Horwich AL, Saibil HR. (2001) "ATP-bound states of GroEL captured by cryo-electron microscopy" *Cell* 107(7):869-79.
- Roseman AM, Chen S, White H, Braig K, Saibil HR. (1996) "The chaperonin ATPase cycle: mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL", *Cell* 87(2):241-51.
- Röbke, M (2001) "Time-Resolved Small Angle Scattering of Proteins", Dissertation, TU München
- Röbke, M, Manakova, E, Holzinger, J, Vanatalu, K, May, R.P, and Heumann, H. (2000) "Time-resolved small-angle neutron scattering of proteins in solution", *Physica B* 276-278, 532-533.
- Röbke, M, Manakova, E, Nawroth, T, Holzinger, J, Narayanan, T, Bernstorff, S, Amenitsch, H, Heumann, H. (2000) "Time-resolved small angle scattering : Kinetic and

structural data from proteins in solution", *Journal of Applied Crystallography*, vol. 33, 548-551

Rye HS, Roseman AM, Chen S, Furtak K, Fenton WA, Saibil HR, Horwich AL. (1999) "GroEL-GroES cycling: ATP and nonnative polypeptide direct alternation of folding-active rings" *Cell*. Apr 30;97(3):325-38.

Schmidt M, Rutkat K, Rachel R, Pfeifer G, Jaenicke R, Viitanen P, Lorimer G, Buchner J. (1994) "Symmetric complexes of GroE chaperonins as part of the functional cycle" *Science*. 265(5172):656-9

Schoehn G, Hayes M, Cliff M, Clarke AR, Saibil HR. (2000) "Domain rotations between open, closed and bullet-shaped forms of the thermosome, an archaeal chaperonin" *J Mol Biol.*; 301(2):323-32.

Schoehn G, Quaiter-Randall E, Jimenez JL, Joachimiak A, Saibil HR. (2000) Three conformations of an archaeal chaperonin, TF55 from *Sulfolobus shibatae*" *J Mol Biol*; 296(3):813-9.

Schurtenberger P, Egelhaaf SU, Hindges R, Maga G, Jonsson ZO, May RP, Glatter O, Hubscher U. (1998) "The solution structure of functionally active human proliferating cell nuclear antigen determined by small-angle neutron scattering", *J Mol Biol*. 275(1):123-32.

Shtilerman M, Lorimer GH, Englander SW. Chaperonin function: folding by forced unfolding. (1999) *Science*. Apr 30;284(5415):822-5.

Sparrer H, Lilie H, Buchner J. (1996) "Dynamics of the GroEL-protein complex: effects of nucleotides and folding mutants. " *J Mol Biol*. Apr 26;258(1):74-87.

Sparrer H, Rutkat K, Buchner J. (1997) "Catalysis of protein folding by symmetric chaperone complexes", *Proc Natl Acad Sci* 94(4):1096-100.

Stegmann R. (1998) "Untersuchung des Chaperonsystems GroE mit Neutronenkleinwinkelstreuung", Dissertation, TU München

Stegmann R, Manakova E, Rossle M, Heumann H, Nieba-Axmann SE, Pluckthun A, Hermann T, May RP, Wiedenmann A. (1998) "Structural changes of the *Escherichia coli* GroEL-GroES chaperonins upon complex formation in solution: a neutron small angle scattering study", *J Struct Biol*. 121(1):30-40

Svergun DI (1992) "Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria", *Journal of Appl. Crystall.* 25, 495-503

Svergun DI, Richard S, Koch MH, Sayers Z, Kuprin S, Zaccai G. (1998) "Protein hydration in solution: experimental observation by x-ray and neutron scattering." *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 3;95(5):2267-72.

Svergun, DI Stuhrmann, HB (1991) "New developments in direct shape determination from small-angle scattering. 1. Theory and model calculations." *Acta Crystallogr*. A47, 736-744.

Svergun, DI, Volkov, VV, Kozin, MB Stuhrmann, HB (1996) "New developments in direct shape determination from small-angle scattering. 2.Uniqueness." *Acta Crystallogr*. A52, 419-426.

Tanonaka K, Yoshida H, Toga W, Furuhashi K, Takeo S. (2001) "Myocardial heat shock proteins during the development of heart failure. " *Biochem Biophys Res Commun*. May 4;283(2):520-5.

Thirumalai D, Lorimer GH. (2001) "Chaperonin-mediated protein folding. " *Annu Rev Biophys Biomol Struct*.;30:245-69

Thiyagarajan P, Henderson SJ, Joachimiak A. (1996) "Solution structures of GroEL and its complex with rhodanese from small-angle neutron scattering", *Structure* 4(1):79-88.

Torok Z, Vigh L, Goloubinoff P. (1996) "Fluorescence detection of symmetric GroEL14(GroES7)2 heterooligomers involved in protein release during the chaperonin cycle" *J Biol Chem*. Jul 5;271(27):16180-6.

Trent JD, Kagawa HK, Yaoi T. (1998) "The role of chaperonins in vivo: the next frontier", *Ann N Y Acad Sci*; 851:36-47.

Trent JD, Kagawa HK, Yaoi T, Olle E, Zaluzec NJ. (1997) "Chaperonin filaments: the archaeal cytoskeleton? ", *Proc Natl Acad Sci U S A*; 94(10):5383-8.

van der Vies SM, Gatenby AA, Georgopoulos C. (1994) "Bacteriophage T4 encodes a co-chaperonin that can substitute for *Escherichia coli* GroES in protein folding" *Nature*. 368(6472):654-6

Williams C, May RP, Guinier A (1994) in "Characterisation of Materials", E. Lifshin ed., Vol 2B of "Material Science and Technology", VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, 615-656, Small-Angle Scattering of X-Rays and Neutrons

Xu Z, Horwich AL, Sigler PB. (1997) "The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)7 chaperonin complex", *Nature*. 388(6644):741-50.

Yaoi T, Kagawa HK, Trent JD. (1998) "Chaperonin filaments: their formation and an evaluation of methods for studying them" *Arch Biochem Biophys*.; 356(1):55-62.

Yifrach O, Horovitz A. (1998) "Transient kinetic analysis of adenosine 5'-triphosphate binding-induced conformational changes in the allosteric chaperonin GroEL." *Biochemistry*. May 19;37(20):7083-8.

Yifrach O, Horovitz A. (2000) "Coupling between protein folding and allostery in the GroE chaperonin system" *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 15;97(4):1521-4.

Zahn R, Lindner P, Axmann SE, Pluckthun A. (1996) "Effect of single point mutations in citrate synthase on binding to GroEL." *FEBS Lett*. Feb 12;380(1-2):152-6.

## 7. Abkürzungen

ADP	Adenosin 5'diphosphat
ATP	Adenosin 5'triphosphat
AMP-PNP	5'-Adenylylimidodiphosphat
ATP $\gamma$ S	Adenosin 5'-o-(3-thiotriphosphat)
Da	Dalton (g/mol)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetreessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
KDa	kiloDalton (kg/mol)
MBP	Maltose-binding Protein
MBPm	Mutante von Maltose-binding Protein
MOPS	3-[N-Morpholin]propansulfonsäure
P <sub>i</sub>	freies Phosphat
p(r)-Funktion	Abstandverteilungsfunktion
R <sub>G</sub>	Gyrationsradius
SANS	Small angle neutron scattering (Neutronenkleinwinkelstreuung)
SAXS	Small angle X-ray scattering (Röntgenkleinwinkelstreuung)
SAS	Small angle scattering (Kleinwinkelstreuung)
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan

## Danksagung

Dr. Roland P. May hat mich während meiner Diplomarbeit und Doktorarbeit am ILL betreut und viele Stunden im Gedankenaustausch mit mir verbracht. Vielen Dank dafür und für das freundschaftliche Klima dabei.

Bei Dr. Hermann Heumann bedanke ich mich für die Möglichkeit, diese Dissertation unter seiner Verantwortung durchzuführen und für die zahlreichen fruchtbaren Gespräche.

Dr. Elena N. Manakova hat den größten Teil in dieser Arbeit verwendete Proteins gereinigt und war bei vielen SANS-Experimenten persönlich beteiligt. Vielen Dank dafür und für die vielen wissenschaftlichen und privaten Diskussionen.

Vielen Dank auch an

- Dr. Manfred Rößle für die Hilfe bei vielen Experimenten und die anregenden Diskussionen.
- Dr. Kalju Vanatalu für die Zucht der *E.coli*-Stämme für deuteriertes Protein.
- Dr. Irina Gutsche für die angenehme und fruchtbare Zusammenarbeit zum Thermosom.
- Dr. Saulius Grazulis für die Hilfe bei der Modellierung von Thermosom-Mikrokristallen.
- Dr. Thomas Nawroth für seine große Unterstützung bei den stopped-flow-Experimenten.
- Prof. Dr. Saskia van der Vies für das vertrauensvolle Überlassen des GP31 und die anregenden Diskussionen.
- Dr. Martina Beissinger und Prof. Dr. Johannes Buchner für die Übermittlung des Know-hows für die Reinigung des MBP.
- Dr. José Texeira für seine Unterstützung beim SANS-Experiment am LLB.
- Dr. Albrecht Wiedenmann für seine Unterstützung beim SANS-Experiment am HMI.
- die Mitglieder der Large-Scale-Structure-Gruppe am ILL, besonders Johannes Zipfel und Florian Nettesheim für wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Unterhaltungen, Bergwanderungen und Skiexkursionen.
- die Heumann-Gruppe am MPI für Biochemie für schönen Stunden, die ich mit ihnen verbracht habe, sowie den Tee und die Kekse.
- Crina Petec-Calin für die menschliche Betreuung während dieser Arbeit.

Vielen Dank an das Institut Laue-Langevin, das Laboratoire Léon Brillouin (LLB) und das Hahn-Meitner-Institut für die Neutronenmeßzeit, die diese Arbeit ermöglicht hat.

Beim ILL, dem Deutschen Akademischen Auslandsdienst und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung.



## Lebenslauf

Jörg Holzinger  
14, quai Perrière  
38000 Grenoble  
Frankreich

### persönliche Daten:

geboren am:	20.12.1970
in:	Nürnberg
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

### Ausbildung und Lebensweg:

3/1998-3/2002:	Doktorarbeit in Biochemie Zusammenarbeit zwischen MPI für Biochemie, Martinsried (Doktorvater: PD Dr. Hermann Heumann) und Institut Laue-Langevin Grenoble (Betreuer: Dr. Roland P. May) Thema: Untersuchung der Reaktionszyklen von Chaperoninen mit Hilfe der Neutronenkleinwinkelstreuung
4/2001-3/2002:	wissenschaftlicher Mitarbeiter am MPI für Biochemie
3/2001-7/2001:	Stipendiat des DAAD
3/1998-3/2001:	Doktorandenvertrag am ILL
9/1997-2/1998:	wissenschaftlicher Aufenthalt am ILL
11/1991-8/1997:	Universität Regensburg, Studium der Biologie
11/1996-8/1997:	Diplomarbeit Betreuung durch PD Dr. Johannes Buchner (Universität Regensburg) und Dr. Roland May (Institut Laue-Langevin, Grenoble) Thema: Untersuchungen zur Substratbindung des Escherichia coli Chaperonin GroEL

12/1993-8/1997:	Hauptstudium Hauptfach: Biophysik  Nebenfächer: Mikrobiologie, physikalische Chemie, Experimentalphysik
10/1994-7/1995:	Auslandsaufenthalt an der Université Joseph Fourier Grenoble (Frankreich), Studium der Biochemie
12/1993:	Vordiplom
8/1990-10/1991:	Zivildienst, dermatologische Universitätsklinik Erlangen
1981-1990:	Gymnasium Hilpoltstein
1977-81:	Volksschule Obermässing (Grundschule)

#### Publikationen:

Gutsche I, Holzinger J, Rauh N, Baumeister W, May RP. (2001) "ATP-induced structural change of the thermosome is temperature-dependent" J Struct Biol. Aug;135(2):139-46.

Gutsche, I., Holzinger, J., Röble, M., Heumann, H., Baumeister, W., and May, R.P. (2000) "Conformational rearrangements of an archeal chaperonin upon ATPase cycling", Current Biol., 10, 405-408.

Holzinger, J., Heumann, H., Manakova, E., Röble, M., Vanatalu, K., Wiedenmann, A., and May, R.P. (2000) "GroEL single-ring solution structure obtained by small-angle neutron scattering", Physica B 276-278, 528-529

Röble, M., Manakova, E., Nawroth, T., Holzinger, J., Narayanan, T., Bernstorff, S., Amenitsch, H., Heumann, H. (2000) "Time-resolved small angle scattering : Kinetic and structural data from proteins in solution", Journal of Applied Crystallography, vol. 33, 548-551.

Röble, M., Manakova, E., Holzinger, J., Vanatalu, K., May, R.P., and Heumann, H. (2000) "Time-resolved small-angle neutron scattering of proteins in solution", Physica B 276-278, 532-533.

Gutsche, I., Holzinger, J., Röble, M., Heumann, H., Baumeister, W., and May, R.P. (2000) "How ATP induces structural changes of an archaeal chaperonin ", ILL Annual Report

München, den 6.2.2002